

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Mgr. Renata Ptáčková

Aplikační potenciál modifikačních metod (chemická činidla, foto-nanosondy) a hmotnostní spektrometrie pro studium struktury proteinů a jejich vzájemných interakcí

Application potential of modification approaches (chemical agents, photo-nanoprobes) and mass spectrometry to study protein structure and protein-protein interactions

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Miroslav Šulc, PhD.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....
Mgr. Renata Ptáčková

Prohlášení spoluautorů

Prohlašuji, že Mgr. Renata Ptáčková rozhodujícím způsobem (20 – 80%) přispěla ke vzniku všech tří odborných publikací, které jsou přílohami této disertační práce. Sama provedla většinu experimentů a významně se podílela i na jejich plánování, na interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze dne

.....

doc. RNDr. Miroslav Šulc, PhD.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mému školiteli Miroslavu Šulcovi a to nejen za odborné vedení během mé práce a studia, ale především za věnovaný čas a energii, za velmi vlídný přístup a notnou dávku trpělivosti. Poděkování patří i mému kolegovi Tomáši Ječmenovi za cenné rady a ochotu kdykoli pomoci.

Dále bych ráda poděkovala všem ostatním spolupracovníkům z Laboratoře charakterizace molekulární struktury a z Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. a kolegům z laboratoří Katedry biochemie PřF UK v Praze a to především za užitečné rady během mé experimentální práce a za velmi přátelské pracovní prostředí. Petru Novákovi bych chtěla poděkovat za provedené hmotnostně-spektrometrické analýzy. Speciální dík patří i Petru Haladovi, Alanu Kádkovi a Danielu Kavanovi za vyřešení jakýchkoli problémů nejen technického rázu a Zdeňku Kukačkovi za velkou ochotu a pomoc při finalizaci mé disertační práce. Děkuji také Janu Milichovskému a Věře Černé.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala mojí milované mamince za důvěru, kterou ve mě vkládala už od dětství a za to, že mne vždy podporovala ve všem, co jsem si předsevzala. Velký dík v tomto směru patří i mému manželovi za každodenní snahu s čímkoli pomoci a za neustálou oporu. Na tomto místě bych chtěla vyjádřit vděk i všem ostatním členům mé rodiny.

Na závěr bych ráda poděkovala za poskytnuté finanční prostředky. Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (P207/12/0627) a Univerzity Karlovy (projekty UNCE 204025/2012 a GA UK 903413).

Abstrakt

K pochopení fyziologické funkce proteinů je nezbytná znalost jejich prostorového uspořádání, studium konformačních změn a vzájemných interakcí. Chemické zesíťení v kombinaci s hmotnostní spektrometrií představuje vhodnou doplňkovou techniku k běžným metodám strukturní biologie (RTG krystalografie, NMR spektroskopie), která umožňuje charakterizovat interakce v komplexech bílkovin za nativních podmínek. Předkládaná práce je zaměřena především na novou síťovací techniku založenou na *in vivo* inkorporaci analogu methioninu s foto-reaktivní funkční skupinou (foto-Met) do sekvence studovaného proteinu (tzv. proteinová foto-nanosonda).

Interakce modelové dimerní molekuly proteinu 14-3-3zeta byla použita pro testování a optimalizaci přípravy proteinové foto-nanosondy a byla tak ověřena využitelnost této techniky k zachycení protein-proteinových interakcí. Byla řešena také interakce membránových hemoproteinů - cytochromu P450 2B4 a cytochromu b5. S využitím chemického zesíťení a MS analýzy byla charakterizována vzájemná interakce katalytických domén cytochromů a byly nalezeny dvě možné prostorové orientace cytochromů. Nově zavedená technika síťování pomocí foto-Met umožnila zachytit různé oligomerní stavy katalyticky aktivního membránového komplexu a byl stanoven molární poměr cytochromů v identifikovaných komplexech.

Abstract

A comprehensive understanding of physiological role of proteins requires knowledge of their three-dimensional structure, dynamics and protein-protein interactions. Chemical cross-linking in combination with mass spectrometry represents an alternative approach to standard methods for protein structure elucidation (X-ray crystallography, NMR spectroscopy) and enables characterization of interaction interface within protein complexes in their native states. The presented thesis is mainly focused on novel cross-linking methodology based on the *in vivo* incorporation of methionine analog with photo-reactive functional group (photo-Met) into the sequence of studied protein (so called protein photo-nanoprobe).

Interaction between two molecules of 14-3-3zeta protein was used as a model to test and optimize the protein photo-nanoprobe production. The findings confirmed usefulness of this approach for mapping the protein-protein interactions. The photo-initiated cross-linking was used to detect the heterooligomeric membrane structures of cytochromes P450 2B4 and b5 and the molar ratio of cytochromes within individual complexes was assessed. The chemical cross-linking in combination with mass spectrometry was employed to characterize the interaction of their catalytic domains and two mutual orientations of cytochromes were determined. Thus, the contact surface regions between membrane hemoproteins were studied.

OBSAH

Seznam zkratk	9
1 Úvod	11
2 Přehled literatury a metodiky	12
2.1 Struktura a fyziologická funkce proteinů	12
2.1.1 Biologický význam proteinů	12
2.1.2 Metody strukturní biologie	13
2.2 Hmotnostní spektrometrie jako nástroj ke studiu struktury proteinů a protein-proteinových interakcí	15
2.2.1 Hmotnostně spektrometrická analýza	15
2.2.2 Speciální techniky MS vhodné pro účely strukturní biologie	22
2.2.3 Kombinace technik chemického zesílení a MS	25
2.3 Inkorporace nepřírodních aminokyselin do struktury proteinů	32
2.3.1 „Místně-specifická“ inkorporace	34
2.3.2 „Aminokyselinově-specifická“ inkorporace	35
2.4 Modelové proteinové systémy	38
2.4.1 Regulační proteiny 14-3-3	38
2.4.2 Cytochromy P450 a b5	41
3 Cíle práce	45
4 Výsledky a diskuse	46
4.1 Aplikace nové síťovací techniky pomocí foto-Met v kombinaci s MS ke studiu protein-proteinových interakcí: využití modelové interakce v homodimeru lidského regulačního proteinu 14-3-3zeta	46
4.2 Optimalizace postupu pro inkorporaci foto-aktivovatelných analogů aminokyselin do struktury proteinů během rekombinantní exprese v bakteriálních buňkách	50
4.3 Kombinace chemického síťování pomocí EDC a MS analýzy k mapování interakce cytochromu P450 2B4 a cytochromu b5	53
4.4 Studium molární stechiometrie membránového komplexu cytochromu P450 2B4 a cytochromu b5	56
5 Závěry	60
Seznam publikací	61
Použitá literatura	62

Přílohy.....	69
--------------	----

SEZNAM ZKRATEK

AKAP79	Protein ukotvující A-kinasu (z angl. A-Kinase Anchoring Protein 79)
ATP	Adenosintrifosfát (z angl. Adenosine TriPhosphate)
CCS	Efektivní srážkový průřez iontů v plynné fázi (z angl. Collision Cross Section)
CID	Fragmentace iontů v důsledku srážek s kolizním plynem (z angl. Collision Induced Dissociation)
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
cyt b5	Cytochrom b5
DLPC	1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-fosfocholin (z angl. 1,2-DiLauroyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine)
ECD	Fragmentace iontů záchytem elektronu (z angl. Electron Capture Dissociation)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
EM	Elektronová mikroskopie
ER	Endoplazmatické retikulum
ESI	Ionizace elektrosprejem (z angl. ElectroSpray Ionization)
ETD	Fragmentace iontů přenosem elektronu (z angl. Electron Transfer Dissociation)
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FTICR	Hmotnostní analyzátor na principu iontové cyklotronové rezonance s využitím Fourierovy transformace (z angl. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High-Performance Liquid Chromatography)
H/D výměna	Vodík/deuteriová výměna
IAA	Jod acetamid (z angl. IodoAcetAmide)
IM-MS	Kombinace iontové mobility s hmotnostní spektrometrií (z angl. Ion Mobility Mass Spectrometry)
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid
IRMPD	Infračervená multifotonová disociace iontů (z angl. InfraRed Multiphoton Dissociation).
LB médium	nutričně bohaté médium (z angl. Lysogeny Broth/Luria-Bertani)

LC	Kapalinová chromatografie (z angl. Liquid Chromatography)
MALDI	Ionizace/desorpce laserem v přítomnosti matrice (z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
MFO	Oxygenasy se smíšenou funkcí (z angl. Mixed Function Oxidases)
MM-M9	Minerální médium M9
mRNA	Informační ribonukleová kyselina (z ang. Messenger RiboNucleic Acid)
MS	Hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NADPH	Redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát (z angl. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)
NKR-P1A	Rodina receptorů zabíječských buněk C-lektinového typu (z angl. Natural Killer Receptor - Protein 1)
NMD	Degradace chybné mRNA (z angl. Nonsense Mediated mRNA Decay)
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OD ₆₀₀	Optická denzita při 600 nm
PVDF	Polyvinyliden difluorid
Pyl	Pyrrolysin
P450 2B4	Cytochrom P450 2B4
RP	Obrácená fáze (z angl. Reverse Phase)
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (z angl. Sodium Dodecyl Sulfate)
Sec	Selenocystein
SORI-CID	Trvalé mimorezonanční ozařování (z angl. Sustained Off-Resonance Irradiation)
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin (z angl. Tris(2-CarboxyEthyl)Phosphine)
TOF	Hmotnostní analyzátor doby letu (z angl. Time Of Flight)
tRNA	Transferová ribonukleová kyselina (z ang. Transfer RiboNucleic Acid)
WT	Přirozená forma proteinu (z angl. Wild Type)

1 ÚVOD

Předkládaná disertační práce je zaměřena na studium struktury a interakcí biologicky významných proteinových komplexů. Z metodického hlediska byly použity síťovací techniky v kombinaci s hmotnostně-spektrometrickou analýzou s cílem získat jasnější představu o fyziologické funkci studovaných proteinů. Zabývala jsem se především optimalizací postupu pro *in vivo* inkorporaci nepřírozených aminokyselin do struktury proteinů během rekombinantní exprese v bakteriálních buňkách a vývojem nového metodického postupu síťování pomocí foto-aktivovatelných analogů aminokyselin na modelové interakci v homodimeru lidského regulačního proteinu 14-3-3zeta. Dále jsem se věnovala strukturně-funkčnímu studiu biotransformačních enzymů systému oxygenas se smíšenou funkcí lokalizovaného na membráně endoplazmatického retikula, konkrétně interakci králičího cytochromu P450 a cytochromu b5.

Tato práce vychází ze souboru publikací, které byly sepsány na základě výsledků získaných během mého doktorského studia v rámci výzkumné skupiny doc. RNDr. Miroslava Šulce, PhD. na Katedře biochemie PřF UK v Praze a na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v.v.i. Teoretická část předkládané disertační práce (kapitola 2) poskytuje ucelený přehled dosavadních poznatků a metodických přístupů souvisejících s řešenou problematikou. Materiál a přesné experimentální postupy využité ke splnění stanovených cílů (viz kapitola 3) jsou detailně popsány v jednotlivých publikacích, které jsou přílohou disertační práce. Publikované výsledky jsou stručně popsány a diskutovány v kapitole 4 a důležité závěry jsou shrnuty v kapitole 5.

2 PŘEHLED LITERATURY A METODIKY

2.1 Struktura a fyziologická funkce proteinů

2.1.1 Biologický význam proteinů

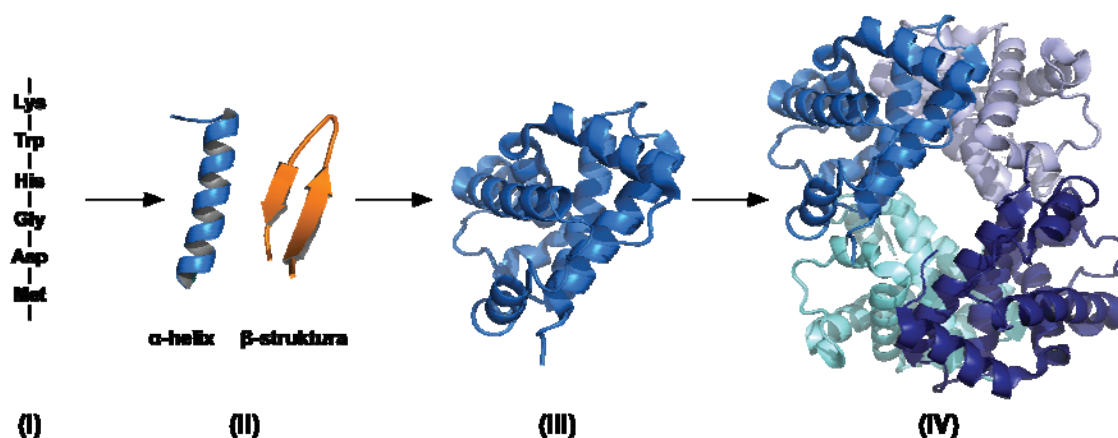
Veškeré děje probíhající v živých organismech jsou úzce spjaty s přítomností biologických makromolekul - proteinů, nukleových kyselin nebo polysacharidů. Důležitou úlohu má rovněž fosfolipidová membrána, která rozděluje vnitřek buňky na jednotlivé kompartmenty a odděluje vnitřní část buňky od vnějšího prostoru. Zatímco nukleové kyseliny uchovávají genetickou informaci, proteiny se přímo účastní fyziologických procesů v buňce, jako je metabolická katalýza, přeměna energie nebo komunikace s vnějším prostředím.

I přes fakt, že základním stavebním prvkem všech bílkovin je skupina 20-ti aminokyselin, proteiny se vyznačují různou velikostí a komplexností. Liší se v molekulové hmotnosti a počtu podjednotek (polypeptidových řetězců). Mohou být kovalentně či nekovalentně spojeny se složkami lipidů, se sacharidy, nukleovými kyselinami, mohou vázat fosfátovou skupinu, flaviny, hem, ionty kovů a různé organické molekuly. Z hlediska funkce se jedná o velmi rozmanitou skupinu, patří sem např. enzymy a regulační proteiny, hormony, složky imunitního systému nebo receptory pro signální molekuly. Proteiny plní funkci zásobní (např. kasein v mléce), transportní (přenos kyslíku hemoglobinem), kontraktilní (aktin a myosin ve svalu) a strukturní (kolagen v pojivových tkáních) [Whitford 2005a].

V souvislosti s pokroky v sekvenaci lidského genomu rapidně vzrostl počet identifikovaných proteinů. Fyziologická funkce většiny z nich však zůstává neznáma a to zejména díky chybějícím znalostem o prostorovém uspořádání. Pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci (tzv. primární struktura) totiž sama o sobě přímo nevypovídá o biologické aktivitě molekuly proteinu. Rozlišujeme ještě další dvě úrovně organizace proteinů – sekundární struktura (vzájemné uspořádání aminokyselinových zbytků, které se nachází blízko sebe v polypeptidovém řetězci) a terciární struktura (prostorové uspořádání vzdálených aminokyselinových zbytků, které jsou součástí různých prvků sekundárních struktur). V případě proteinů tvořených z více podjednotek mluvíme

ještě o kvartérní struktuře [Whitford 2005b]. Úrovně struktury proteinů jsou znázorněny na Obr. 1.

Správné uspořádání proteinu do nativní (biologicky aktivní) formy je rozhodující pro plnění jeho funkce v organismu a není tedy divu, že se v současné době věnuje velká pozornost vývoji metod k určování trojrozměrného uspořádání proteinů.



Obr. 1: Úrovně struktury proteinů. Primární struktura (I) je určena sekvencí aminokyselin. Uspořádání části polypeptidového řetězce v prostoru působením vodíkových vazeb mezi karbonylovými a imidovými skupinami hlavního řetězce proteinu tvoří prvky sekundární struktury - α -helix, β -struktura, ohyby (II). Terciární struktura (III) je stabilizována nekovalentními interakcemi a je dána prostorovým uspořádáním elementů sekundární struktury v rámci jednoho řetězce. Vzájemná poloha několika polypeptidových řetězců je označována jako kvartérní struktura (IV). Obrázek byl vytvořen pomocí programu PyMOL (www.pymol.org) s využitím online databáze struktur proteinů (www.pdb.org).

2.1.2 Metody strukturní biologie

K běžným metodám používaným k určování struktury biologických makromolekul patří rentgenová krystalografie [Parker 2003], NMR spektroskopie [Mittermaier 2006] nebo kryo-elektronová mikroskopie [Mirne 2013]. S využitím těchto technik byla v posledních letech publikována celá řada studií. Počet vyřešených proteinových struktur stále narůstá stejně jako velikost a složitost molekul, které je možné v současné době analyzovat.

První dva uvedené přístupy poskytují data s vysokým rozlišením. Rentgenová krystalografie je nejpoužívanější technikou pro studium trojrozměrného uspořádání

proteinů a jejich komplexů s vazebnými ligandy. Principem je difrakce rentgenového záření na krystalech proteinu. RTG záření je rozptylováno elektronovými obaly atomů, přičemž velikost atomů je srovnatelná s vlnovou délkou RTG záření (řádově 10^{-10} m). Výsledkem měření je difrakční obraz krystalu, který je po překonání tzv. fázového problému (je měřena amplituda rozptýlených vln, ale chybí informace o fázovém posunu) a zapojení Fourierovy transformace převeden na mapu elektronové hustoty, na jejímž základě je sestaven strukturní model molekuly. Rozhodujícím a často limitujícím krokem tohoto experimentálního postupu je nalezení podmínek vhodných pro krystalizaci proteinu za současného udržení stability molekuly.

Zatímco rentgenová krystalografie poskytuje informace o umístění všech atomů kromě vodíku (elektronový obal vodíku je příliš malý pro detekci rozptýleného záření), NMR zaznamenává pozice atomů s nenulovým jaderným spinem (např. ^1H či ^{13}C). Výhodou NMR je studium struktury v roztoku bez nutnosti přípravy krystalu. Limitujícím faktorem je však potřeba vysoké koncentrace proteinu (přibližně mM), která může vést k jeho nežádoucí precipitaci. Na rozdíl od rentgenové krystalografie, která představuje statický obraz proteinu, pomocí NMR je možné zachytit různé konformační stavy. Omezením NMR je velikost proteinů, které mohou být analyzovány (desítky kDa v závislosti na rozpustnosti studovaného proteinu a přístrojovém vybavení).

Velkou výzvu na poli strukturní analýzy představují membránové proteiny [Whitelegge 2013], které jsou nejčastějším cílem při vývoji terapeutik k léčbě závažných onemocnění [Katritch 2012]. Z experimentálního hlediska je studium jejich uspořádání v prostoru značně ztíženo právě díky lokalizaci uvnitř lipidové dvojvrstvy, která je klíčová pro plnění jejich biologické funkce. Zásadní překážkou při studiu struktury proteinů je fakt, že většina z nich je součástí více či méně složitých proteinových komplexů. Proteiny mohou tvořit stabilní komplexy nebo mohou pouze dočasně interagovat s dalšími proteiny či jinými typy biomolekul jako jsou nukleové kyseliny nebo lipidy. Složení a konformace proteinových komplexů se mění v závislosti na jejich funkci a proteiny tak tvoří dynamický systém, který je hlavní hnací silou buňky [Alberts 1998; Barabasi 2004].

Z hlediska strukturní biologie je tedy kromě řešení vlastní trojrozměrné struktury biomolekul zajímavé studovat také aspekty konformačních změn (proteinová dynamika) [Henzler-Wildman 2007], identifikovat interakční partnery a charakterizovat molekulární interakce [Boehr 2009; Robinson 2007]. I přes značné pokroky ve vývoji výše uvedených

přístupů, z experimentálního hlediska je jejich použití stále omezeno velikostí, heterogenitou a dynamikou proteinových komplexů stejně jako ukotvením proteinů na membráně.

V současné době však máme k dispozici další alternativní přístupy umožňující doplnění chybějících informací o struktuře a dynamických vlastnostech, které jsou nezbytné pro pochopení úlohy proteinů v organismu. Patří sem např. Ramanova spektroskopie nebo infračervená spektroskopie. Velmi populární je maloúhlový RTG rozptyl, metoda známá pod zkratkou SAXS (z angl. Small-Angle X-ray Scattering). V posledních letech se do popředí zájmu dostávají techniky založené na hmotnostně-spektrometrické analýze [Kaltashov 2013]. Hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. Mass Spectrometry) poskytuje data s nízkým rozlišením a slouží tak jako komplementární technika k tradičním metodám strukturní biologie. Předností MS je rychlost analýzy, vysoká citlivost měření a s tím související nízká spotřeba analyzovaného vzorku. Unikátnost této metody spočívá v možnosti analýzy proteinů v roztoku za fyziologických podmínek. Pomocí MS tak můžeme zachytit a charakterizovat jednotlivé konformační stavy proteinu, které jsou v roztoku v rovnováze [Sinz 2007]. Vzhledem k technologickému vývoji a velkému rozmachu nejrůznějších přístupů, MS poskytuje cenné informace o dynamice a vzájemných interakcích a lze tuto analýzu s výhodou použít i na membránové proteiny a proteinové komplexy.

2.2 Hmotnostní spektrometrie jako nástroj ke studiu struktury proteinů a protein-proteinových interakcí

2.2.1 Hmotnostně spektrometrická analýza

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která umožňuje charakterizovat a kvantifikovat širokou škálu látek a našla tak uplatnění v celé řadě vědních oborů. Předmětem předkládané práce je studium struktury a interakcí proteinů a proto zde budou dále probírány pouze přístupy MS, které lze uplatnit při analýze proteinů. Je však na místě popsat základní principy MS. Tato technika pracuje s nabitými částicemi analytu, které jsou v důsledku působení elektrického a magnetického pole separovány na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) a následně detekovány. Klíčovými kroky jsou tedy ionizace molekul analytu, ke které dochází v iontovém zdroji, separace vzniklých molekulových iontů v plynné fázi v analyzátoru a zachycení iontů na

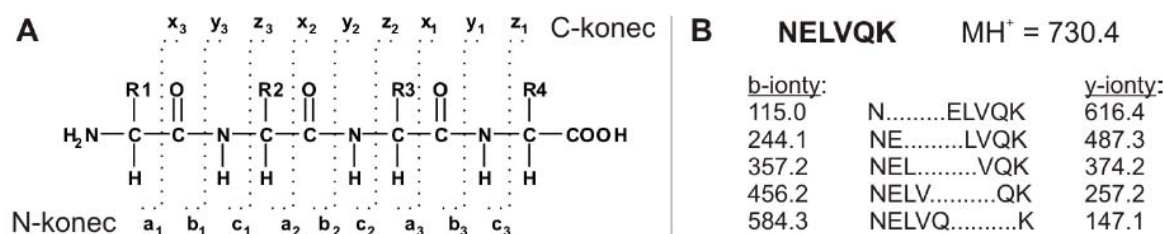
detektoru. Výstupem měření je hmotnostní spektrum, kde je na ose x vynesena hodnota m/z pro jednotlivé ionty dopadající na detektor a na ose y jejich četnost [Dass 2007a].

Rozvoj aplikací MS na studium biologických makromolekul úzce souvisel s vývojem nových ionizačních technik. K velkému rozmachu došlo na konci 80. letech minulého století, kdy se začaly používat tzv. měkké ionizační techniky – ionizace/desorpce laserem v přítomnosti matrice (MALDI, z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) [Karas 1988, Tanaka 1988] a ionizace elektrosprejem (ESI, z angl. ElectroSpray Ionization) [Fenn 1989], které umožňují převádět polární látky o vysoké molekulové hmotnosti do plynné fáze, aniž by docházelo k jejich nežádoucí fragmentaci. Obě tyto techniky byly v roce 2002 oceněny Nobelovou cenou. Detailněji budou popsány v následující podkapitole.

Spojení s vhodným hmotnostním analyzátozem je rovněž důležité z hlediska dosažení uspokojivých experimentálních výsledků. K rozhodujícím parametrům analyzátoru patří rozlišení (schopnost rozlišit od sebe dva signály o podobné hodnotě m/z), správnost (míra schopnosti určit správnou hodnotu m/z), hmotnostní rozsah (rozmezí hodnot m/z , přes které analyzátor může zaznamenat spektrum), dynamický rozsah (rozmezí koncentrací, přes které odezva detektoru vykazuje lineární závislost) a rychlost záznamu spekter [Holčápek 2012]. K dělení iontů v analyzátoru dochází za vysokého vakua (10^{-3} - 10^{-5} Pa, podle typu analyzátoru) na základě různých fyzikálních principů. S ionizací typu MALDI bývá nejčastěji spojován průletový analyzátor (TOF, z angl. Time Of Flight), ve kterém jsou ionty děleny podle různé doby letu. K dalším běžně používaným analyzátorům patří např. kvadrupólový analyzátor (označení Q nebo q pokud analyzátor slouží jako kolizní cela), 3D a lineární iontová past nebo orbitrap [Dass 2007c]. K největšímu pokroku však došlo s příchodem iontové cyklotronové rezonance v roce 1974 [Comisarow 1974a, b]. Moderní hmotnostní spektrometry založené na principu iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FTICR, z angl. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) nabízí nejvyšší rozlišovací schopnost při krátké době analýzy (více než 100 000 pro hodnotu m/z 1000) a správnost určení hodnoty m/z (méně než 1 ppm) [Marshall 2000]. Analyzátoři iontů TOF a FTICR byly použity při měřeních, které jsou součástí této práce, a proto budou jejich principy a vlastnosti detailněji rozebrány v samostatné podkapitole.

Za účelem zlepšení vlastností přístroje se často používají hybridní hmotnostní spektrometry sestávající ze dvou a více různých typů analyzátorů. Uspořádání alespoň

dvou hmotnostních analyzátorů za sebou, tzv. tandemová MS neboli MS/MS, nám navíc umožňuje provádět experimenty, díky kterým jsme schopni určit aminokyselinové sekvence peptidů a stanovit přesnou polohu místa modifikace v případě zesítěných („cross-linkovaných“) proteinů (viz kapitola 2.2.3). Principem tandemové MS je fragmentace iontů analytu a to nejčastěji v důsledku srážek s inertním tzv. kolizním plynem (CID, z angl. Collision Induced Dissociation). Při MS/MS uspořádání je v prvním kroku vybrán ion o m/z odpovídající studované molekule jejíž fragmentační spektrum chceme získat. Tento tzv. prekurzorový ion je v dalším kroku podroben CID a následně je měřeno spektrum iontů vzniklých rozpadem vybraného prekurzoru. V MS/MS spektru jsou charakteristické signály pro komplementární série iontů (viz Obr. 2). V případě CID je typický výskyt y- a b- iontů, neboť přednostně dochází k fragmentaci na peptidové vazbě. Každý signál z y- či b-iontové série odpovídá ztrátě jedné, dvou, tří atd. aminokyselin od C- nebo N- konce peptidu. Na základě rozdílu hodnot m/z dvou následujících fragmentů v dané sérii můžeme stanovit přítomnou aminokyselinu (všechny proteinogenní aminokyseliny mají charakteristickou molekulovou hmotnost kromě isobarických Leu a Ile) a určit tak sekvenci peptidu [Aebersold 2003].



Obr. 2: Fragmentace prekurzorového iontu při tandemové MS analýze. Schéma fragmentace peptidového řetězce a nomenklatura vzniklých iontů (A). Určení aminokyselinové sekvence s využitím komplementární b- a y- série iontů. Jako příklad byl zvolen peptid o m/z 730,4 získaný trypsinizací proteinu 14-3-3zeta. Převzato z [Haladová 2011].

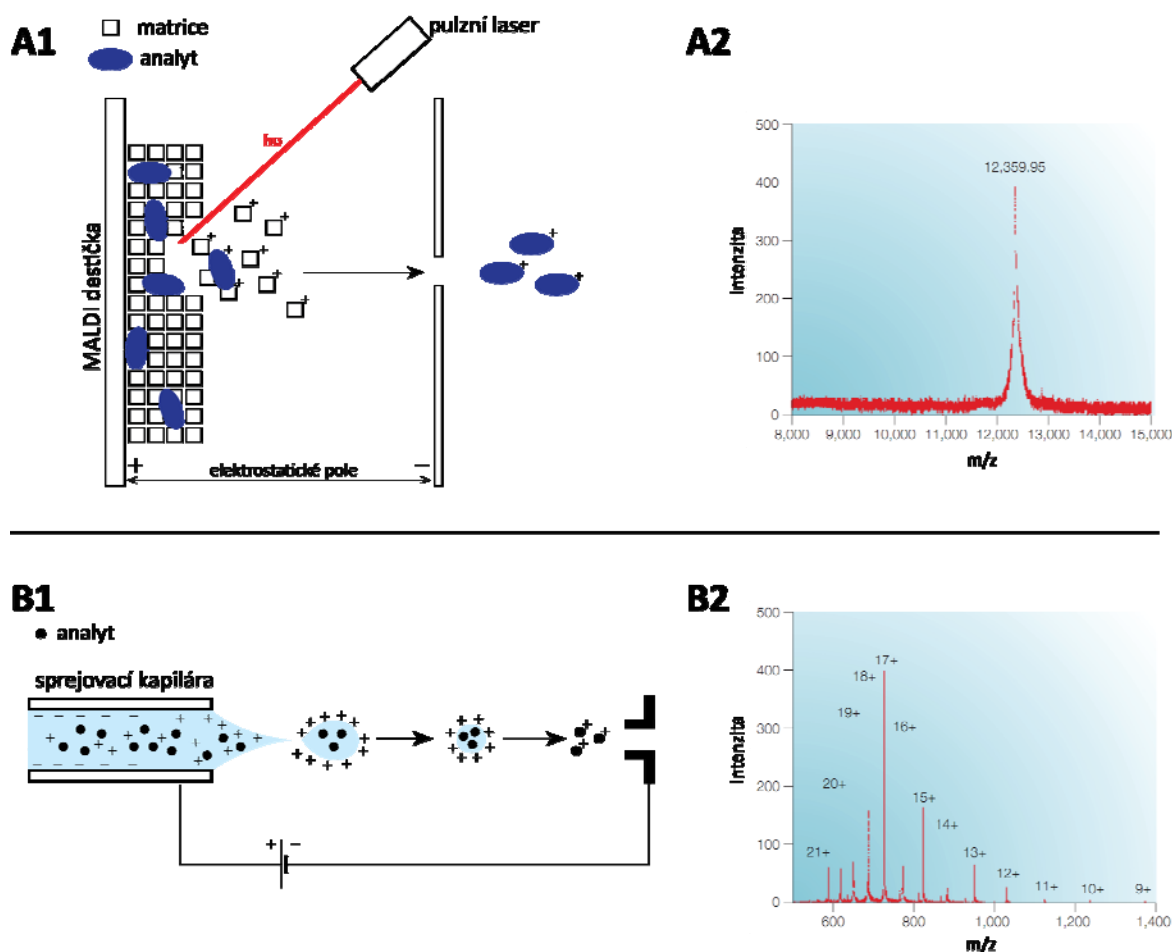
Jako příklad instrumentalizace pro MS/MS analýzu lze uvést TOF/TOF, kde dochází k fragmentaci energeticky nabohacených metastabilních iontů nebo QqTOF, kde první kvadrupól slouží k výběru prekurzorového iontu, druhý funguje jako kolizní cela a fragmentové ionty jsou děleny pomocí analyzátoru TOF [Aebersold 2003, Dass 2007d]. CID je nejpoužívanější fragmentační technikou díky své univerzálnosti [McLucky 1992]. Existují i další typy fragmentace, které mají své výhody a určitá specifika zejména

z hlediska instrumentace [Sleno 2004]. K běžně používaným patří disociace záchytem elektronu (ECD, z angl. Electron Capture Dissociation) nebo přenosem elektronu (ETD, z angl. Electron Transfer Dissociation) a multifotonová disociace infračerveným zářením (IRMPD, z angl. InfraRed Multiphoton Dissociation). K fragmentaci může docházet i přímo v iontovém zdroji (např. u tvrdých ionizačních technik), MS spektrum pak obsahuje fragmentové ionty vzniklé ze všech iontů přítomných v daný moment ve zdroji včetně nečistot.

“Měkké” ionizační techniky MALDI a ESI

Jak vyplývá z názvu, u techniky MALDI se ke vzorku přidává nízkomolekulární matrice. Při UV-MALDI se nejčastěji používají deriváty aromatických kyselin (skořicové, benzoové), které jsou schopny absorbovat energii záření laseru díky hodnotě vlnové délky absorpčního maxima v blízkosti vlnové délky používaného laseru (např. UV záření o vlnové délce 337 nm v případě dusíkového laseru). Po ozáření směsi analytu a matrice krátkým laserovým pulsem dochází k absorpci energie záření matricí a k následnému odpaření matrice, která strhává analyt a současně dochází k jeho protonaci/deprotonaci za vzniku kladně či záporně nabitých iontů (Obr. 3 A1 na str. 19). Přesný mechanismus ionizace je stále předmětem studia [Knochenmuss 2003, Dreisewerd 2003, Karas 2003]. Jak už bylo uvedeno, MALDI se nejčastěji pojí s průletovým analyzátozem iontů a našla své uplatnění při zobrazovacích metodách a také v celé řadě dalších aplikací [Chaurand 2012, Inutan 2012].

V případě ESI je roztok analytu rozstříkovan z vyhřívané sprejovací kapiláry s vloženým napětím. Působením silného elektrického pole mezi kapilárou a vstupem do hmotnostního spektrometru dochází k tvorbě Taylorova kuželu, z jehož konce se uvolňují malé vysoce nabitě kapičky. Postupným odpařováním rozpouštědla s následným rozpadem kapiček v důsledku Coulombické repulze vznikají většinou vícenásobně nabitě ionty analytu, které vstupují do hmotnostního analyzátoru (Obr. 3 B1 na str. 19). Za účelem zvýšení citlivosti lze použít k nástřiku analytu tenčí kapiláru, což vede ke snížení průtoku kapaliny a ke vzniku menších kapek, mluvíme pak o nano-ESI [Wilm 1994, Wilm 1996]. Peptidové směsi jsou často před nástřikem separovány pomocí kapalinové chromatografie (LC, z angl. Liquid Chromatography) nebo v případě složitějších peptidových směsí pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie na obrácené fázi (RP-HPLC, z angl. Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography) [Sinz 2007].



Obr. 3: Principy ionizace a srovnání získaných hmotnostních spekter při použití technik MALDI a ESI. Během MALDI (A1) je směs analytu v nadbytku matrice ozářena laserovým pulzem a převedena do plynné fáze za současné protonace molekul analytu. V MALDI spektru (A2) je charakteristický signál odpovídající hodnotě m/z jedenkrát nabitého iontu. Při ESI (B1) je roztok analytu sprejován do oblasti s vysokým napětím za vzniku nabitých kapek, jejichž postupným odpařováním (ve vyhřívané kapiláře) dochází k přechodu analytu do plynné fáze. V důsledku různé míry protonace během ESI jsou ve spektru patrné signály pro různé nábojové stavy iontů – $z > 1$ (B2). Schéma A1 a B1 bylo upraveno dle [Dass 2007b], naměřená spektra cytochromu c A2 a B2 byla převzata z [Glish 2003].

Výhodou MALDI je snadná interpretace naměřených spekter vzhledem k tomu, že při tomto typu ionizace vznikají především jedenkrát nabité ionty (Obr. 3 A2). V případě analýzy biomolekul pomocí ESI se ve spektru většinou vyskytují vícenásobně nabité ionty a vyhodnocování naměřených dat je tak složitější (Obr. 3 B2). Další předností MALDI oproti ESI je menší náročnost na čistotu analyzovaného vzorku. U ESI i nízká koncentrace soli, detergentu či jiné nečistoty vede ke snížení citlivosti metody a navíc může docházet

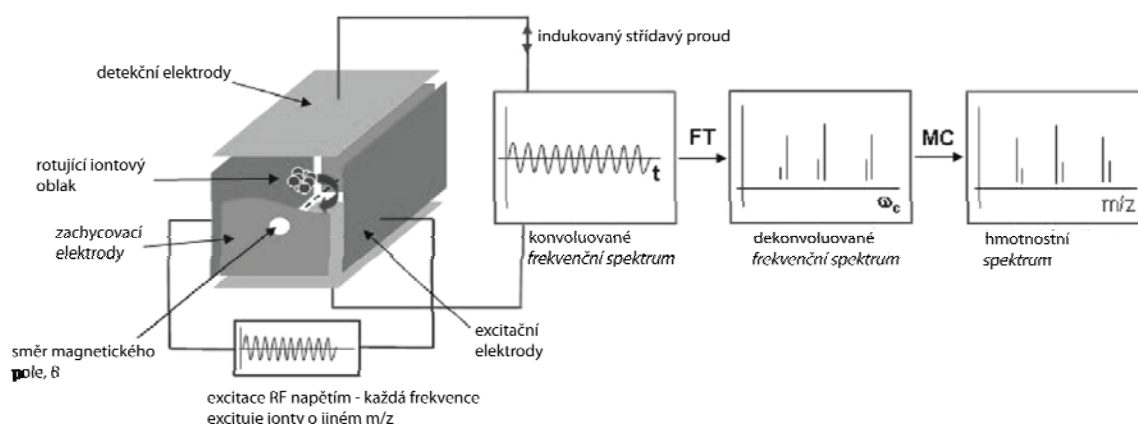
k tvorbě aduktů s analytem, což ještě více znesnadňuje interpretaci získaných spekter [Dass 2007b]. Přesto má z hlediska strukturních studií mnohem větší využití ionizační technika ESI oproti MALDI. Hlavním důvodem je možnost přímého spojení s kapalinovou chromatografií a kombinace téměř s jakýmkoli hmotnostním analyzátozem. Díky tvorbě několikanásobně nabitých iontů je při ionizaci elektrosprejem usnadněna fragmentace iontů pomocí CID [Paizs 2005], ECD [Zubarev 2008] nebo ETD [Coon 2009, Zhurov 2013] během MS/MS experimentů.

Hmotnostní analyzátory iontů TOF a FTICR

Analyzátor iontů TOF patří technicky i principiálně k nejjednodušším a v kombinaci s MALDI představuje klasický nástroj používaný pro analýzu biologických makromolekul. Základní princip tohoto pulzního analyzátoru publikoval v roce 1946 William E. Stephens [Stephens 1946]. Ionty jsou na vstupu do letové trubice analyzátoru urychleny krátkým napěťovým pulsem (je jim přidělen stejný moment hybnosti), a poté se měří doba letu (řádově ns- μ s), za kterou urazí přesně definovanou dráhu a dopadají na detektor. Ionty se pohybují letovou trubicí různou rychlostí v závislosti na jejich m/z , přičemž ionty s menší hodnotou m/z se pohybují rychleji a tedy doletí k detektoru za kratší čas. Předností analyzátoru TOF je teoreticky neomezený hmotnostní rozsah. Nevýhodou analýzy v tzv. lineárním módu, kdy je měřena přímá dráha letu, je poměrně nízké rozlišení získaných dat. Rozlišovací schopnost lze zvýšit použitím tzv. iontového zrcadla neboli reflektoru. Ionty o stejné m/z jsou charakterizovány kinetickou energií s určitou distribucí a v důsledku tedy různou měrou pronikají do elektrického pole reflektoru. Zpoždění iontů je přitom úměrné jejich kinetické energii, ale není závislé na hodnotě m/z . Dalším způsobem, kterým je možné dosáhnout lepšího rozlišení je opožděná extrakce (z angl. delayed extraction) iontů z MALDI zdroje, kdy v důsledku vzájemných srážek iontů před vstupem do analyzátoru dochází k zúžení intervalu hodnot kinetických energií částic o stejné m/z [Dass 2007c].

MS s analyzátozem na principu ICR s využitím Fourierovy transformace (Obr. 4 na str. 21), zkráceně FTICR MS nebo jen FTMS, představuje v současnosti nejvhodnější nástroj pro analýzu proteinů a jejich komplexů. Tato technika může být kombinována jak s ESI tak MALDI. Ionty analytu jsou přes několik stupňů se vzrůstajícím vakuem přiváděny do ICR cely, která je umístěna uvnitř prostorově homogenního supravodivého magnetu s vysokým statickým magnetickým polem. Silné magnetické pole nutí ionty

přivedené do cely k pohybu po spirálovité dráze jako důsledek působení Lorentzovy síly a odstředivé síly, které působí proti sobě. V okamžiku vyrovnaní sil se částice pohybují po kruhové dráze. Uvnitř cely jsou ionty drženy účinkem elektrostatického pole, které je vkládáno na zachycovací elektrody umístěné na obou koncích cely. Podél cely jsou naproti sobě vloženy excitační elektrody, na které je aplikován frekvenční napěťový puls, v jehož důsledku dochází k excitaci iontů o určité stejné hodnotě m/z a vzniká tak oblak koherentně se pohybujících iontů. Pohyb oblaku excitovaných iontů, které jsou v rezonanci s daným excitačním napětím, je sledován měřením generovaného střídavého proudu na dvou detekčních elektrodách, které tvoří zbylé dvě stěny cely. Při použití různých frekvencí excitačního napětí tak lze postupně změřit cyklotronové frekvence pro všechny ionty v požadovaném hmotnostním rozsahu. Takto získané frekvenční spektrum je podrobeno dekonvoluci metodou Fourierovy transformace a následně převedeno na klasické hmotnostní spektrum. Tato technika byla detailně popsána v několika pracích [Amster 1996, Marshall 1998, Marshall 2002, Heeren 2004, Boháč 2005].



Obr. 4: Schematické znázornění FTICR MS. Ionty analytu vstupující do ICR cely jsou excitovány radiofrekvenčním (RF) napěťovým pulzem. Pohyb oblaků iontů je sledován na detekčních elektrodách. Měřená frekvence indukovaného proudu, která odpovídá cyklotronové frekvenci iontů, je nepřímo úměrná hodnotě m/z a intenzita je úměrná počtu iontů. Záznam cyklotronových frekvencí pro všechny ionty o určité m/z v čase (konvoluované spektrum) je metodou Fourierovy transformace (FT) dekonvoluován a pomocí hmotnostní kalibrace (MC) převeden na klasické hmotnostní spektrum. Převzato z [Boháč 2005].

Kromě extrémně vysoké rozlišovací schopnosti, správnosti měření a citlivosti je ve srovnání s ostatními hmotnostními analyzátory výhodou FTICR i to, že jde

o nedestruktivní techniku detekce iontů. Lze ji tedy s výhodou využít k následným MS/MS a MSⁿ experimentům za použití různých metod fragmentace iontů (IRMPD [Little 1994], SORI-CID [Gauthier 1991], ECD [Zubarev 1998]).

2.2.2 Speciální techniky MS vhodné pro účely strukturní biologie

Strukturní MS analýza nám umožňuje charakterizovat vlastnosti biologických makromolekul v roztoku a usuzovat tak o jejich trojrozměrném uspořádání. Díky nejrozličnějším MS technikám můžeme navíc studovat dynamiku proteinů a jejich komplexů a to i přes fakt, že změny konformace přímo neovlivňují měřenou hodnotu m/z [Konermann 2014].

Strukturní data získaná na základě MS přístupů, které budou diskutovány v této kapitole, mají především významnou úlohu při modelování struktury proteinů a jejich komplexů a to zejména v případech, kdy nejsou k dispozici data s vysokým rozlišením v důsledku vysoké flexibility a dynamiky částí polypeptidového řetězce [Konijnenberg 2013]. Díky široké aplikaci MS technik v kombinaci s informacemi, které byly nasbírány tradičními metodami strukturní biologie (RTG krystalografie, NMR a kryo-EM), tak máme k dispozici vhodný nástroj k tomu, abychom mohli získat jasnější představu o biologické funkci proteinů.

Metody MS založené na *in vitro* kovalentní modifikaci proteinů

Velmi populární jsou metody založené na kovalentní modifikaci, které jsou s výhodou využívány k mapování protein-proteinových interakcí a ke sledování konformačních změn proteinů. K nejpoužívanějším patří vodík/deuteriová (H/D) výměna, kovalentní značení pomocí hydroxylového radikálu a modifikace činidly pro chemické zesíťení neboli „cross-linking“. Kovalentní modifikace probíhá vždy v roztoku za fyziologických podmínek a modifikované proteiny jsou následně analyzovány pomocí MS a tandemové MS [Konijnenberg 2013].

U H/D výměny (detailní popis metody viz [Zhang 1993, Englander 1996, Kaltashov 2002, Hossain 2005, Englander 2006]) dochází během inkubace proteinu v roztoku s deuterovaným rozpouštědlem k postupnému nahrazování atomů vodíku (¹H) za atomy deuteria (²H nebo označí D). Na rozdíl od kovalentního značení, kdy jsou modifikovány postranní řetězce aminokyselin, v případě H/D výměny jsou značeny pouze amidové vodíky, které jsou součástí peptidové vazby. Výměna ostatních vodíkových

atomů hlavního řetězce polypeptidu je velmi pomalá, takže nemůže být v rámci měření detekována. Vodíkové atomy funkčních skupin v postranním řetězci mohou být rovněž deuterovány, v tomto případě je ale rychlost výměny tak vysoká, že nijak neovlivňuje výsledek měření. Kromě fyzikálně chemických vlivů jako jsou teplota a pH závisí rychlost H/D výměny na přístupnosti dané části molekuly rozpouštědлу a na zapojení příslušných atomů vodíku ve vodíkových vazbách, které jsou hlavním stabilizačním prvkem sekundární struktury proteinů. Jedná se o velmi šetrnou metodu, neboť náhrada vodíků za deuterium nemá žádný vliv na terciální strukturu proteinů. Kovalentní značení je komplementární metodou k H/D výměně. Výhodnou a často používanou technikou kovalentní modifikace je nespecifická oxidace přístupných aminokyselinových zbytků účinkem hydroxylového radikálu [Wang 2011, Konermann 2010, Kiselar 2010, Takamoto 2006]. Obě tyto techniky poskytují informace o povrchové přístupnosti jednotlivých částí studovaných molekul. Na základě získaných dat tak můžeme odvodit, která část molekuly je za daných podmínek v interakci s ligandem nebo sledovat změny konformace proteinů.

Principem síťování je kovalentní spojení dvou funkčních skupin, které se nachází blízko sebe v prostorovém uspořádání v rámci jedné nebo dvou molekul proteinu nebo jsou součástí vazebných domén interagujících proteinů. Tato technika umožňuje určovat intra a intermolekulární vzdálenosti a hraje důležitou roli při zpřesňování již navržených strukturních modelů [Leitner 2010, Sinz 2006]. Díky možnosti přesné identifikace interagujících aminokyselinových zbytků je navíc možné s využitím tohoto přístupu studovat uspořádání podjednotek v proteinových komplexech [Lee 2008, Rappsilber 2011]. Technika síťování pomocí chemického činidla EDC nebo s využitím proteinových foto-nanosond byla použita k dosažení výsledků předkládané práce a bude jí proto věnována samostatná kapitola.

Všechny tři zmíněné metody mohou být s výhodou kombinovány. Jako příklad lze uvést studium lidského proteinu serpinu v laboratoři Chance, kdy s využitím H/D výměny a kovalentní modifikace pomocí hydroxylového radikálu byly sledovány dynamické vlastnosti tohoto proteinu v roztoku [Zheng 2008]. Dalším příkladem je studium struktury receptoru NKR-P1A [Rozbeský 2012] nebo homodimerního rozhraní lidského regulačního proteinu 14-3-3 [Haladová 2012]. V těchto případech byla využita kombinace H/D výměny a síťovacích technik k úpravě a zpřesnění struktury získané na základě krystalografických dat s ohledem na chování proteinů v roztoku.

„Nativní“ MS

Cílem MS analýzy je charakterizace vlastností biomolekul v roztoku. Z principu MS je ale zřejmé, že technika je založena na detekci iontů studované látky v plynné fázi. V případě výše popsaných přístupů tento fakt nehraje roli, protože značení (kovalentní modifikace) proteinů probíhá v roztoku a následná MS analýza slouží pouze jako nástroj k vyhodnocování proběhlých změn. Tzv. nativní MS je však postavena na předpokladu, že chování proteinů v roztoku je zachováno i v plynné fázi [Konermann 2014]. Pravdivost tohoto tvrzení představuje na poli strukturní MS analýzy ožehavé téma [Wytenbach 2011, Skinner 2012].

Na základě několika publikací a zejména studií provedených v laboratoři Carol V. Robinson [Robinson 2007, Robinson 2011] bylo v nedávné době ukázáno, že při použití velmi šetrné ionizační techniky ESI (především její miniaturizované varianty nano-ESI), speciální instrumentace a vhodného experimentálního postupu, nedochází k porušení nekovalentních protein-proteinových interakcí, které jsou charakteristické pro daný protein v roztoku za fyziologických podmínek. S využitím ESI-MS a dalších souvisejících přístupů, které analyzují molekuly v plynné fázi, tak můžeme přímo studovat intaktní nekovalentní komplexy proteinů a získat tak cenné informace o kvartérní struktuře. Klíčovými kroky nativní MS jsou proces desolvatace a ionizace za současného převedení intaktního komplexu do plynné fáze, průchod hmotnostním analyzátozem bez nežádoucí disociace a účinná detekce.

V případě ESI je charakteristická různá distribuce nábojových stavů [Kaltashov 2005]. Pro nesbalené molekuly proteinu jsou u ESI-MS typická spektra s výskytem vyšších nábojových stavů iontů (o nižší hodnotě m/z) díky snadnější protonaci během ionizace. Výskyt iontů s nižším nábojem (o vyšší hodnotě m/z) naopak indikuje nativní konformaci molekuly v plynné fázi. Na základě ESI distribuce nábojových stavů tak můžeme studovat dynamiku proteinů. Další strukturní informace je možné získat kombinací nativní ESI-MS a iontové mobility (IM-MS, z angl. Ion Mobility Mass Spectrometry) [Bohrer 2008]. Při IM-MS je studován pohyb iontů v elektrickém poli v prostředí inertního plynu. Chování iontů v inertním prostředí je charakterizováno efektivním srážkovým průřezem iontů v plynné fázi (CCS, z angl. Collision Cross Section). IM-MS tak skrze CCS poskytuje informace o velikosti a tvaru analyzovaných molekul. S využitím CID a dalších fragmentačních technik lze docílit kontrolované disociace nekovalentních komplexů v plynné fázi. Pomocí MS/MS experimentů tak

můžeme navíc získat velmi cenné údaje o složení a stechiometrii proteinových komplexů [Sobott 2003, Hyung 2009]. Ke studiu tzv. multiproteinových komplexů (informace o stechiometrii a identifikace vazebných partnerů) může být využita kombinace nativní IM-MS a síťovacích technik. Studium kvartérní struktury signálního komplexu AKAP79 (z angl. A-Kinase Anchoring Protein 79) je vhodným příkladem demonstrujícím spojení těchto dvou alternativních přístupů [Stengel 2012].

2.2.3 Kombinace technik chemického zesíťení a MS

Metoda síťování je založena na kovalentním spojení dvou funkčních skupin aminokyselinových zbytků v rámci proteinové molekuly nebo komplexu prostřednictvím speciálního činidla. K tvorbě tzv. cross-linků dochází v případě, že vzdálenost postranních řetězců v prostorové struktuře proteinu přibližně odpovídá délce použitého činidla. Pomocí vhodně zvoleného cross-linkeru s určitou specifitou tak můžeme v roztoku za fyziologických podmínek fixovat původní nekovalentní interakce nebo vzdálenosti dvou aminokyselinových zbytků za účelem dalšího studia. Klíčová je optimalizace síťovací reakce tak, aby bylo dosaženo vysokého výtěžku cross-linků, ale nedocházelo přitom k porušení nativní struktury proteinů. Důležitou roli hraje především koncentrace proteinu a použitého síťovacího činidla, inkubační doba a pH [Sinz 2006].

Přístupy založené na síťovacích reakcích a MS přináší řadu výhod: rychlost měření a nízká spotřeba vzorku, teoreticky neomezená velikost studovaných biomolekul (většinou jsou totiž proteiny před MS analýzou štěpeny na menší peptidy), možnost studia struktury proteinů v roztoku, aplikovatelnost i na membránové a složené proteiny nebo flexibilní části proteinové struktury a možnost využití široké škály cross-linkerů.

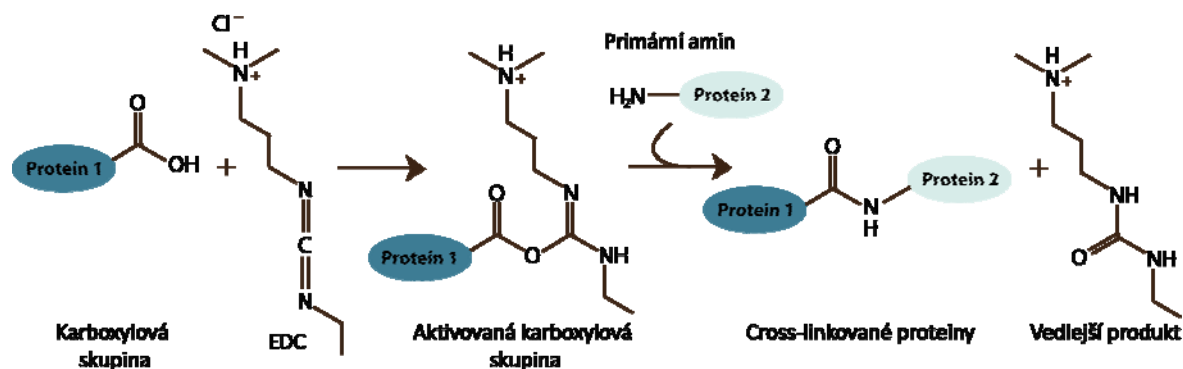
Síťovací činidla

V literatuře byla popsána celá řada síťovacích činidel. Obecně molekula cross-linkeru obsahuje dvě reaktivní skupiny, které jsou spojeny tzv. raménkem, kterým může být různě dlouhý alkylový řetězec. Můžeme je rozdělit do kategorií např. podle toho, s jakou skupinou v postranním řetězci proteinové molekuly interagují nebo dle reakčního mechanismu. Z hlediska strukturních studií je klíčová délka použitého cross-linkeru, která nám umožňuje určit vzdálenost mezi identifikovanými aminokyselinovými zbytky.

K nejpoužívanějším homobifunkčním činidlům patří amin-reaktivní cross-linkery (např. disukcinimidyl suberát a disukcinimidyl glutarát), které interagují s primární

ϵ -aminoskupinou lysinového zbytku nebo s N-koncem proteinu. Síťování přes Lys zbytky se vyznačuje poměrně vysokou reakční specifitou. Výhodou je relativně velké zastoupení Lys v proteinech (okolo 6%) a především vysoká reakční rychlost. Podobná specifita je charakteristická pro sulfo-reaktivní cross-linkery (např. maleinimidy), zastoupení Cys je však výrazně nižší (méně než 2%) [Leitner 2010]. Dalším omezením je participace cysteinových zbytků na stabilizaci struktury proteinů prostřednictvím tvorby disulfidových můstků. Redukcí S-S vazby za účelem následné modifikace volné sulfhydrylové skupiny, tak může dojít k porušení struktury studovaného proteinu [Sinz 2006].

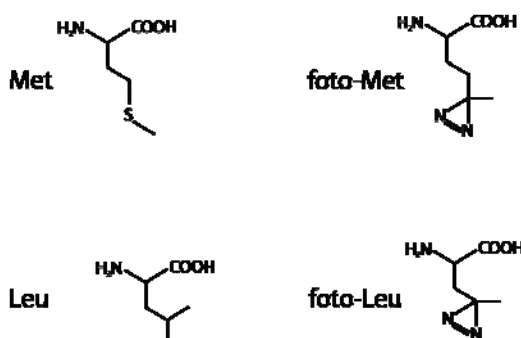
Důležitou úlohu při síťování proteinů mají cross-linkery s „nulovou délkou“. Typickým příkladem jsou ve vodě rozpustné karbodiimidy, zejména 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDC), které propojují karboxylovou skupinu postranního řetězce Asp/Glu a ϵ -aminovou skupinu Lys za vzniku amidové vazby. Pomocí EDC tak dochází ke kovalentnímu spojení interagujících či blízkých aminokyselinových zbytků (do vzdálenosti 5 Å) a molekula cross-linkeru výsledně není součástí produktu síťovací reakce (Obr. 5) [Kalkhof 2005]. Významnou skupinu tvoří foto-reaktivní cross-linkery, které se po ozáření UV světlem vážou nespecificky na aminokyselinové zbytky polypeptidu. Nejčastěji se jedná o látky na bázi aryl azidů, diazirinů a benzofenonů [Sinz 2006].



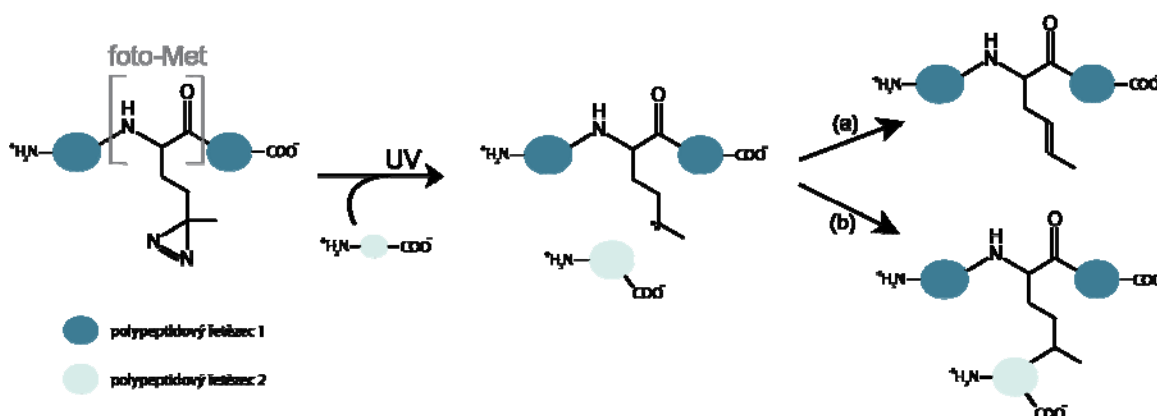
Obr. 5: Reakční schéma síťování pomocí EDC. EDC se kovalentně váže na karboxylovou skupinu za vzniku vysoce reaktivního meziprojektu, který ve druhém kroku interaguje s primární aminovou skupinou. Výsledkem reakce je tvorba cross-linku prostřednictvím nově vytvořené amidové vazby za současného uvolnění molekuly cross-linkeru [Williams 1981].

Velmi perspektivní alternativou je síťování pomocí foto-aktivovatelných aminokyselin (foto-Leu, foto-Met). Díky strukturní podobnosti s přirozenými

aminokyselinami mohou být tyto foto-aktivovatelné analogy (Obr. 6) inkorporovány přímo do struktury proteinu během rekombinantní exprese [Suchanek 2005].



Obr. 6: Srovnání struktur přirozených aminokyselin a jejich foto-aktivovatelných analogů. Chemické vzorce aminokyselin Leu a Met (vlevo) a jejich strukturních analogů foto-Leu a foto-Met (vpravo) obsahujících foto-reaktivní diazirinovou skupinu.



Obr. 7: Reakční schéma síťování pomocí foto-Met. Diazirinová funkční skupina foto-methioninového zbytku je aktivována působením UV záření. Vzniklý vysoce reaktivní karbenový biradikál (a) terminuje za vzniku dvojné vazby nebo (b) se kovalentně váže na jakýkoli aminokyselinový zbytek ve svém blízkém okolí a dochází tak k tvorbě cross-linku s „nulovou délkou“.

Z hlediska reakčního mechanismu se jedná o foto-reaktivní cross-linkery s „nulovou délkou“ (viz publikace v Příloze č. 1 a č. 3). Po ozáření UV světlem dochází k aktivaci přítomné diazirinové skupiny za vzniku molekuly dusíku a vysoce reaktivního karbenového biradikálu na skeletu postranního řetězce analogu aminokyseliny, který se kovalentně váže na jakýkoli aminokyselinový zbytek ve svém blízkém okolí. Na Obr. 7 je schematicky znázorněno síťování pomocí foto-aktivovatelného analogu methioninu (foto-Met). Předností síťování pomocí foto-aktivovatelných aminokyselin je vysoká

reaktivita a nespecifita vazby díky kterým je velmi výhodné používat tuto techniku ve srovnání s klasickými činidly pro chemické zesítení (viz publikace v Příloze č. 1). Navíc, oproti chemickým cross-linkerům, není tento přístup limitován podmínkami síťovací reakce. Další výhodou je, že v důsledku kovalentní interakce, ke které dochází pouze mezi blízkými aminokyselinovými zbytky, nedochází k narušení terciální struktury proteinu. Klíčovým krokem síťování pomocí foto-aktivovatelných aminokyselin je úspěšná inkorporace nepřírozené aminokyseliny do struktury proteinu. Této problematice je věnována kapitola 2.3.

Kromě popsaných síťovacích technik se běžně používají i jejich vzájemné kombinace, které umožňují spojení dvou různých funkčních skupin ve struktuře proteinu (použití heterobifunkčních činidel) nebo mohou být současně využity různé principy síťování (chemická vazba, foto cross-linking) [Leitner 2010]. Existují i cross-linkery, které obsahují navíc třetí funkční skupinu (např. afinitní značku), kterou lze s výhodou využít k nabohacení produktů síťovací reakce [Trester-Zedlitz 2003].

Přístupy „bottom-up“ vs. „top-down“ a *in vivo* síťování

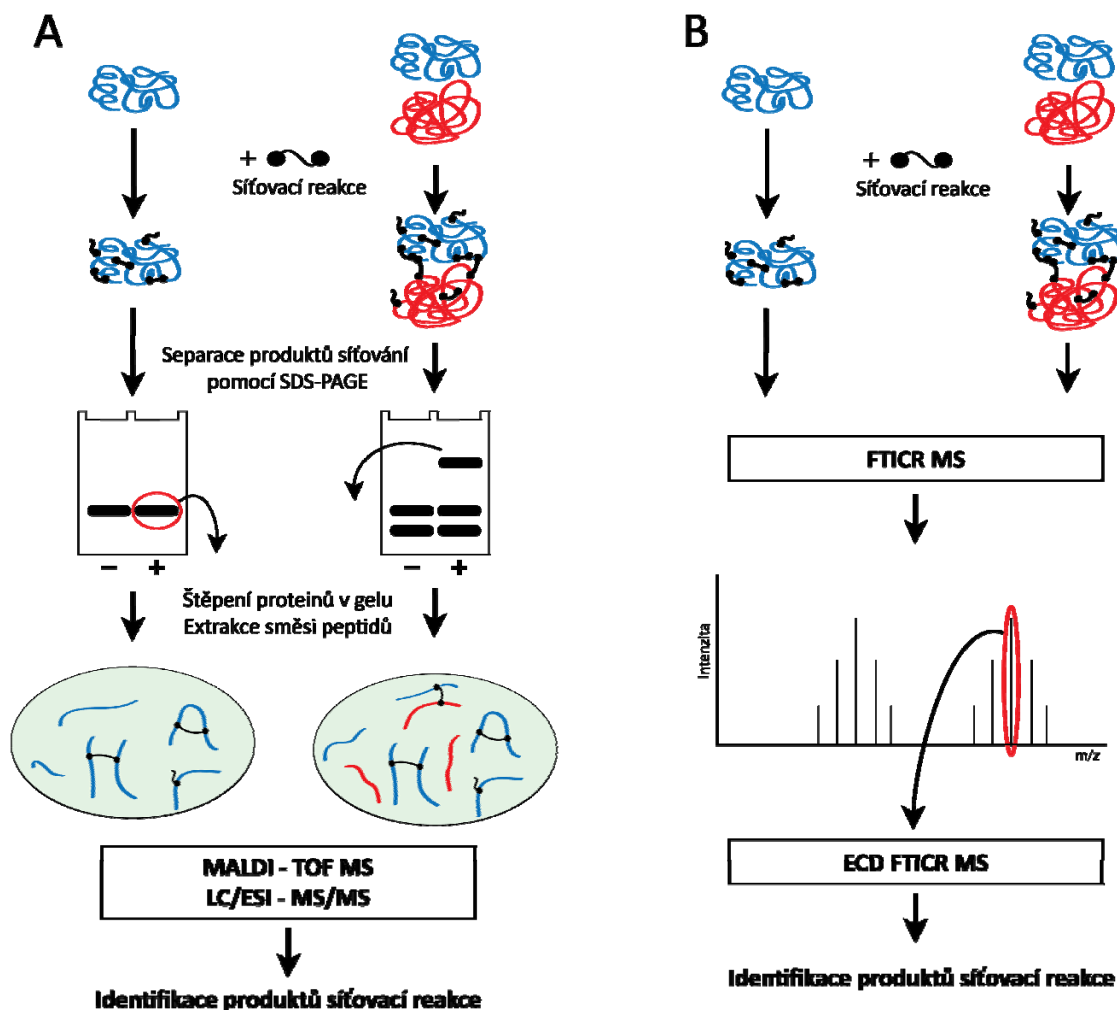
V souvislosti s metodou síťování v kombinaci s MS lze aplikovat dva hlavní experimentální přístupy tzv. „bottom-up“ a „top-down“ (Obr. 8 na str. 29). U „bottom-up“ experimentů je nutná separace kovalentně spojených proteinů např. pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). V dalším kroku jsou jednotlivé produkty síťovací reakce enzymaticky štěpeny, získané peptidové směsi jsou extrahovány z gelu a konečně podrobeny MS analýze. Srovnáním spekter kontrolního vzorku bez přídavku síťovacího činidla a cross-linkovaného proteinu jsou identifikovány signály odpovídající kovalentně spojeným peptidům [Sinz 2006]. S využitím MS/MS a znalosti sekvence studovaného proteinu pak můžeme identifikovat přesnou polohu cross-linků a na základě typu použitého činidla určit vzdálenost kovalentně spojených aminokyselinových zbytků a usuzovat tak o trojrozměrné struktuře proteinu nebo o uspořádání podjednotek v proteinovém komplexu [Young 2000, Sinz 2003].

Nevýhodou tohoto přístupu je, že po proteolýze cross-linkovaného proteinu často vznikají příliš velké peptidy. Jak bylo uvedeno dříve, nejčastěji používaná síťovací činidla interagují s primární aminovou skupinu lysinu nebo s N-koncovou aminoskupinou, což v kombinaci s běžně používanou proteasou trypsinem (štěpí peptidovou vazbu na C-konci Lys a Arg), který nedokáže štěpit za modifikovaným lysinovým zbytkem, může vést

k nedokonalému štěpení. Dalším souvisejícím problémem je zhoršená schopnost detekce větších peptidů s využitím ESI. Modifikace Lys zbytku cross-linkerem, která je spojena se ztrátou pozitivního náboje, totiž zejména v případě větších peptidů vede k výraznému snížení nábojového stavu iontů [Sinz 2006].

„Top-down“ experimenty představují mnohem přímější cestu. V tomto případě jsou cross-linkované proteiny podrobeny MS analýze bez předchozího enzymatického štěpení [Kelleher 1999, McLafferty 1999]. Hlavní MS technikou umožňující tento typ analýzy je ESI-FTICR. Kovalentně spojené proteiny mohou být izolovány přímo v ICR cele a následně fragmentovány nejčastěji pomocí ECD. Předností ECD je možnost fragmentace velkých peptidů za současného zachování post-translačních modifikací a produktů chemického zesíťení. Hlavní výhodou tohoto přístupu oproti „bottom-up“ je možnost separace produktů síťovací reakce přímo v hmotnostním analyzátoru. Problémem je naopak analýza větších proteinových komplexů [Sinz 2006]. Jedním ze způsobů jak lze tuto komplikaci obejít, je využití kombinace obou přístupů, což se v současnosti jeví jako velmi perspektivní alternativa. Jako příklad lze uvést studii hovězího rhodopsinu, kdy byl protein rozštěpen pomocí chemického činidla bromkyanu (štěpí peptidovou vazbu za methioninem za vzniku homocysteinu) na velké peptidové fragmenty („bottom-up“), které byly dále analyzovány pomocí ESI-FTICR MS/MS („top-down“) [Novák 2005].

Technika síťování je běžně aplikována na purifikované proteiny nebo směsi proteinů. Existuje ale i možnost provádět síťovací reakce proteinů v jejich přirozeném prostředí tedy v živých systémech [Chavez 2013]. Pro *in vivo* studie je klíčová volba cross-linkeru, který by byl schopný pronikat do jednotlivých buněčných kompartmentů, aniž by došlo k narušení fyziologické funkce [Bruce 2012]. Z tohoto hlediska se jako vhodný kandidát jeví formaldehyd, který spojuje dva aminokyselinové zbytky skrze methylenový můstek [Klockenbusch 2012]. Jako příklad aplikace *in vivo* síťování pomocí *para*-formaldehydu a MS lze uvést nedávno publikovanou studii zaměřenou na identifikaci interakčních partnerů membránové H^+ ATPasy z pylových zrn lilie [Pertl-Obermeyer 2014]. Dalším přístupem může být zavedení reaktivní skupiny schopné vytvářet cross-linky přímo do struktury proteinu během jeho exprese za pomoci vlastního biosyntetického aparátu buňky (viz publikace v Příloze č. 1). K tomuto účelu lze využít foto-aktivovatelné analogy přirozených aminokyselin [Suchanek 2005]. Této velmi perspektivní alternativě je v současné době věnována velká pozornost.



Obr. 8: Experimentální přístupy „bottom-up“ a „top-down“ při studiu struktury proteinů s využitím sítování a MS. V případě „bottom-up“ (A) jsou produkty sítovací reakce separovány pomocí SDS-PAGE, kovalentně spojené proteiny jsou štěpeny účinkem proteasy a získaná směs peptidů je analyzována pomocí MS a MS/MS za účelem identifikace interagujících aminokyselinových zbytků. U „top-down“ (B) dochází k separaci produktů sítovací reakce během MS experimentu v analyzátoru na principu ICR, kovalentně spojené proteiny jsou fragmentovány a na základě získaného spektra metodou FT je určena přesná poloha cross-linků. Upraveno podle [Sinz 2006].

MS a identifikace produktů sítovací reakce

Největší výzvu z hlediska metody sítování představuje identifikace cross-linkovaných produktů. V důsledku sítování vzniká velmi komplexní směs obsahující velký počet nemodifikovaných peptidů a jen malý zlomek cross-linkovaných peptidů, které nesou strukturní informaci. Vyhodnocování MS spekter proto bývá často připodobňováno k hledání jehly v kupce sena. Situace je ještě ztížena tím, že bifunkční cross-linkery mohou

potenciálně vytvářet čtyři různé typy interakcí: (i) pouze jedna funkční skupina cross-linkeru interaguje s proteinem a druhá podléhá hydrolýze (tzv. mono-link), (ii) interakce mezi blízkými aminokyselinovými zbytky v rámci jednoho peptidu (tzv. loop-link), (iii) kovalentní spojení v rámci jedné molekuly označované jako intramolekulární cross-link a (iv) vznik vazby mezi dvěma podjednotkami proteinového komplexu označovaný jako intermolekulární cross-link (viz Obr. 9). Intramolekulární cross-linky mají vypovídající hodnotu při řešení prostorového uspořádání proteinu. Z hlediska studia protein-proteinových interakcí mají význam pouze intermolekulární cross-linky [Leitner 2010].



Obr. 9: Schematické znázornění a nomenklatura čtyř typů interakcí cross-linkeru s proteinem. Vazba cross-linkeru pouze prostřednictvím jedné funkční skupiny vede k tvorbě tzv. mono-linku (i). Interakce v rámci jednoho peptidu je označováno jako „loop-link“ (ii). Intramolekulární cross-link vzniká kovalentním spojením dvou peptidů, které pochází z jednoho polypeptidového řetězce (iii). Jsou-li cross-linkované peptidy z různých proteinů, produktem síťování je intermolekulární cross-link (iv). Upraveno podle [Leitner 2010].

Za účelem snazší MS identifikace produktů síťovací reakce bylo vyvinuto několik strategií. Jednou z možností je izotopové značení cross-linkeru nebo studovaného proteinu. Dále je možné využít speciálně navržené cross-linkery, které lze štěpit, chemicky nebo během MS/MS analýzy. K běžně používaným přístupům patří nabohacování produktů síťování s pomocí afinitní značky, která může být součástí molekuly cross-linkeru (např. biotin). Klíčový je rovněž rozvoj MS technik. Byla publikována řada studií využívajících k detekci cross-linků MALDI-TOF MS nebo ESI-MS (LC-MS). Největší pokrok však přinesla aplikace FTICR MS, která díky extrémně vysokému rozlišení a správnosti měření umožňuje analýzu komplexních směsí proteinů [Sinz 2006]. S využitím ECD FTICR MS je navíc možné přesně identifikovat aminokyselinové zbytky účastnící se studované interakce [Zubarev 2003].

V posledním desetiletí byly vyvinuty různé počítačové programy k vyhodnocování MS a MS/MS experimentů za účelem automatizace identifikace produktů síťovací reakce

[Leitner 2010]. Např. Links [Young 2000], MS2Links [Schilling 2003], StavroX [Götze 2012] a další. Na základě zadaných vstupních informací jako jsou sekvence proteinu, modifikace postranního řetězce aminokyselin, specifita použité proteasy, specifita síťovacího činidla a změna hodnoty m/z v důsledku tvorby kovalentní vazby je tak možné generovat knihovnu teoretických cross-linků, která je porovnávána s naměřenými daty. S ohledem na nepřehledné množství možných kombinací, které musí být brány v potaz a prohledány, stále chybí univerzální nástroj pro efektivní analýzu cross-linkovaných peptidů. Dostupné programy mají svá specifická úskalí a není tedy výjimečné, že data musí být vyhodnocována manuálně.

2.3 Inkorporace nepřírozených aminokyselin do struktury proteinů

Jak bylo uvedeno výše, základním stavebním kamenem všech proteinů vyskytujících se v přírodě je 20 proteinogenních aminokyselin. Inkorporace dalších aminokyselin do sekvence proteinu na místo přírozených představuje unikátní nástroj pro rozšíření repertoáru experimentálních metod pro studium struktury a biologických funkcí proteinů. Zavádění nepřírozených aminokyselin do struktury proteinů tak má velký význam nejen v oblasti základního výzkumu, ale i v komerční sféře a to především při vývoji nových léčiv a průmyslových enzymů. Vnášení analogů aminokyselin se nejčastěji provádí s cílem zavést do struktury proteinu modifikaci, která přidává proteinu určitou vlastnost, kterou lze s výhodou využít pro nejrůznější aplikace. Významnými příklady jsou určování struktury a proteomické studie, značení proteinu za účelem sledování jeho funkce *in vivo* nebo zachycení transientních protein-proteinových interakcí pomocí síťovacích technik.

K běžně používaným přístupům pro vnášení nepřírozených aminokyselin do proteinů patří chemické metody (chemická modifikace nebo syntéza proteinů, derivatizace postranních řetězců aminokyselin), *in vitro* syntéza proteinů proteosyntetickým aparátem z bezbuněčných extraktů (tzv. mimobuněčný translační systém) a exprese proteinů za pomoci vlastního biosyntetického aparátu buňky [Wang 2012]. S ohledem na zaměření předkládané práce - inkorporace foto-aktivovatelných analogů aminokyselin do sekvence proteinů během rekombinantní exprese v buňkách *E. coli*, se zde budu detailněji zabývat pouze poslední zmíněnou technikou.

Klíčovým krokem translace, biosyntézy polypeptidového řetězce na základě genetické informace uložené v molekule mRNA, je tvorba komplexu mezi příslušnou aminokyselinou a specifickou tRNA. Tato reakce je katalyzována aminoacyl-tRNA synthetasou [Crick 1966, Ibba 2000a]. V prvním kroku dochází k aktivaci aminokyseliny pomocí ATP a ve druhém k vazbě na tRNA za vzniku aminoacylované tRNA, která je uvolněna do cytosolu. Na základě komplementarity trojice bází na mRNA a aminoacylované tRNA a vznikající interakce kodon-antikodon dochází k připojení příslušné aminokyseliny do řetězce polypeptidu, který je syntetizován na ribozomu. Genetický kód obsahuje 61 tripletových kodonů, které specifikují 20 proteinogenních aminokyselin a 3 kodony zodpovědné za ukončení translace proteinu (tzv. stop kodony UAA, UAG, UGA).

Stěžejní pro bezchybnou syntézu polypeptidu je tvorba komplexu aminoacyl-tRNA. Téměř v každé buňce je přítomno 20 aminoacyl-tRNA synthetas specifických pro určitou tRNA a příslušnou aminokyselinu [Woese 2000]. Společně s párováním aminoacyl-tRNA a mRNA prostřednictvím interakce kodon-antikodon, tak translace představuje vysoce regulovaný proces. Některé aminoacyl-tRNA synthetasy však nejsou schopny rozlišit analogy aminokyselin, které jsou strukturně velmi podobné těm přirozeným. Přesnost syntézy polypeptidu však zůstává zachována díky schopnosti eliminace chybně acylované tRNA pomocí dobře vyvinutých opravných mechanismů [Parker 1989, Söll 1995, Ling 2009]. I přesto ale existují určité výjimky v přísné kontrole translačního mechanismu. V nedávné době bylo ukázáno, že kromě dvaceti proteinogenních aminokyselin se u některých organismů vyskytují ještě selenocystein (Sec) [Zinoni 1987] a pyrrolysin (Pyl) [Srinivasan 2002]. Obě tyto aminokyseliny jsou inkorporovány *in vivo* do řetězce polypeptidu prostřednictvím stop kodonu (UGA pro Sec a UAG pro Pyl). K potlačení ukončení translace dochází v obou případech díky specifické sekvenci, která se nachází na mRNA v blízkosti příslušného stop kodonu [Hatfield 2006, Krzycki 2005]. Studie z roku 1957 [Cowie 1957], kde bylo ukázáno, že biosyntetický aparát *E. coli* dokáže využívat selenomethionin na místo přirozeného methioninu, je dalším příkladem demonstrujícím slabinu ve striktní kontrole procesu translace.

S využitím nejrozumnějších postupů – od nejjednodušší substituce přirozené aminokyseliny v důsledku tolerance translačního mechanismu buňky až po složité genetické manipulace, tak můžeme dosáhnout účinné inkorporace analogů aminokyselin. Nepřirozené aminokyseliny mohou být inkorporovány na přesně určené místo v sekvenci

proteinu (tzv. místně-specifická inkorporace z angl. site-specific) nebo mohou být všechny přirozené aminokyseliny v sekvenci nahrazeny příslušným analogem (tzv. aminokyselinově-specifická inkorporace z angl. residue-specific) [Wang 2012]. Správná volba metody je přitom klíčová z hlediska požadované aplikace.

2.3.1 „Místně-specifická“ inkorporace

Místně-specifická inkorporace je obdobou bodové mutace, neboť při ní dochází k cílené substituci určité aminokyseliny v sekvenci proteinu. Pro tuto techniku je klíčové vnesení páru aminoacyl-tRNA synthetasy a tRNA specifického pro požadovaný analog aminokyseliny do zvoleného expresního organismu. Aby nedocházelo k nespecifické inkorporaci analogu, musí být zaručeno, že vnesená aminoacyl-tRNA synthetasa umožňuje vazbu nepřirozené aminokyseliny pouze na svou partnerskou tRNA a nikoli na tRNA přítomné v hostitelském organismu. Obdobně vnesená tRNA musí být aktivována pouze svou párovou aminoacyl-tRNA synthetasou, aby bylo zajištěno, že do požadovaného místa v sekvenci bude inkorporován pouze analog aminokyseliny. Za tímto účelem jsou využívány ortologní páry aminoacyl-tRNA synthetasy a tRNA z jiných organismů [Noren 1989] nebo jsou syntetizovány „*de novo*“ [Neumann 2010]. Funkční ortologní pár aminoacyl-tRNA synthetasa/tRNA může být selektován z knihovny mutantů s využitím různých postupů (viz [Wang 2012]).

Nejpoužívanější metoda pro místně-specifickou inkorporaci vychází z výše zmíněného mechanismu inkorporace Sec a Pyl na základě stop kodonu. K přepisu stop kodonu, resp. k potlačení terminace translačního procesu dochází v důsledku mutací antikodonu tRNA nebo v důsledku chybného párování kodonu mRNA s antikodonem tRNA [Beier 2001]. Stěžejními kroky tohoto experimentálního postupu jsou zavedení kodonu UAG do požadovaného místa templátové molekuly mRNA, izolace supresorové tRNA rozpoznávající stop kodon a selekce (případně syntéza) aminoacyl-tRNA synthetasy, která je schopna katalyzovat vazbu zvoleného analogu aminokyseliny na supresorovou tRNA. Hlavním omezením této techniky je nízký výtěžek exprimovaného proteinu [Cho 2011], neboť pouze 10-40% stop kodonů přítomných v sekvenci mRNA je translatováno a to zejména díky kompetici aminoacylované tRNA s proteinem zodpovědným za ukončení procesu translace (tzv. uvolňovací faktor rozpoznávající stop kodon). S tím souvisí i omezený počet míst pro vkládání nepřirozených aminokyselin (s rostoucím počtem stop kodonů se mnohonásobně snižuje produkce proteinu). Výtěžek

exprese je nižší i v důsledku zvýšené degradace mRNA kontrolním buněčným mechanismem (NMD, z angl. Nonsense Mediated mRNA Decay). Tento problém byl překonán delecí genu zodpovědného za NMD v případě použití kvasinkového expresního systému. [Wang 2008].

S ohledem na výše zmíněné nedostatky inkorporace pomocí stop kodonu jsou neustále vyvíjeny další alternativní postupy založené na inserci ortologního páru aminoacyl-tRNA synthetasy a tRNA využívající: (i) nestandardní párování bází mezi tRNA a mRNA (např. mnoho organismů má pouze jednu tRNA, která rozpoznává dva různé kodony na mRNA pro Phe) [Kwon 2003], (ii) degenerované kodony, které nejsou preferovány vybraným expresním organismem, určitou tkání nebo typem buněk (např. u *E. coli* jsou dva z šesti kodonů pro Arg používány jen zřídka) [Hohsaka 1994] nebo (iii) posun čtecího rámce v důsledku čtyřbázového antikodonu na tRNA [Anderson 2004]. Další možností je „*de novo*“ syntéza a modifikace genomu hostitelského organismu [Gibson 2010] s cílem odstranit endogenní komponenty translačního systému, které kompetují s inkorporací nepřírozené aminokyseliny (např. genom obsahující méně než 61 kodonů, eliminace tRNA nebo uvolňovacího faktoru v případě využití stop kodonu). Lze použít geneticky upravené organismy schopné vlastní biosyntézy analogu aminokyseliny [Zhang 2010]. Je známo i několik studií využívajících k inkorporaci nepřírozených aminokyselin ortologní ribozom [Rackham 2005, Wang 2007, Neumann 2010b].

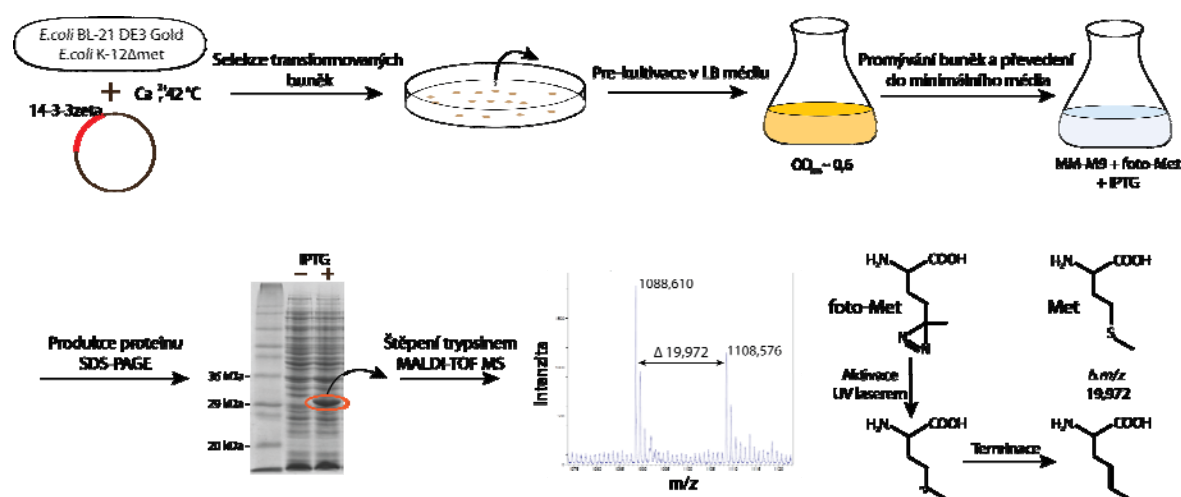
S pomocí kombinace uvedených postupů a ortologních párů (aminoacyl-tRNA synthetasa/tRNA nebo ribozom/mRNA) z různých organismů (nejčastěji *Methanococcus jannaschii* [Wang 2001] ale i např. *S. cerevisiae* [Kwon 2003] nebo *E. coli* [Chen 2007]) a za použití bakteriálních, kvasinkových či savčích expresních systémů, tak byla cíleně inkorporována celá řada funkčních skupin do struktury proteinů.

2.3.2 „Aminokyselinově-specifická“ inkorporace

Zatímco místně-specifická inkorporace je založena čistě na molekulárně-biologických technikách, druhý zmíněný přístup se obejde bez náročnější genetické manipulace. V tomto případě aminoacyl-tRNA synthetasa přítomná v hostitelském organismu katalyzuje nespecifickou vazbu analogu aminokyseliny na příslušnou tRNA. Vzniklá aminoacylovaná tRNA je následně využita k translaci na ribozomu a analog je tak na základě kódující sekvence na mRNA připojen do rostoucího

polypeptidového řetězce na místo přirozené aminokyseliny [Wang 2012]. Klíčové pro tuto techniku je, že modifikované aminokyseliny, které mají být inkorporovány, musí být strukturně velmi podobné přirozeným aminokyselinám, aby unikly přísné kontrole translačního mechanismu buňky.

Schéma experimentu na příkladu zabudování foto-aktivovatelného analogu Met do struktury proteinu 14-3-3zeta za použití bakteriálního expresního systému je znázorněno na Obr. 10. Buňky jsou kultivovány v nutričně bohatém médiu, následně jsou promývány a poté převedeny do minerálního média, které obsahuje foto-Met místo přirozeného Met. Přidáním induktoru je zahájena exprese proteinu. Produkce 14-3-3zeta je kontrolována pomocí SDS-PAGE a inkorporace foto-Met je sledována pomocí MALDI-TOF MS (viz publikace v Příloze č. 1).



Obr. 10: Schéma experimentu pro *in vivo* inkorporaci foto-Met do struktury 14-3-3zeta. V prvním kroku jsou transformovány kompetentní buňky *E. coli* (standardní expresní kmen nebo mutant s deletovanou dráhou pro syntézu Met) pomocí Ca^{2+} a teplotního šoku plazmidem nesoucím cílový gen. Vybraný expresní klon je pre-kultivován v LB médiu. Při dosažení hodnoty OD_{600} přibližně 0,6 jsou buňky sklizeny centrifugací a promývány. Po odstranění LB média je peleta resuspendována v minerálním médiu M9 (MM-M9) s obsahem foto-Met místo Met. Přídavkem induktoru (např. IPTG) je spuštěna exprese proteinu, která je po sklizení buněk kontrolována pomocí SDS-PAGE. Protein je štěpen trypsinem a získaná peptidová směs je extrahována z gelu. Míra inkorporace je sledována pomocí MALDI-TOF MS na základě rozdílu v hodnotě m/z pro peptid s přirozeným Met a foto-Met, který činí 19,972 hmotnostních jednotek.

Míra inkorporace nepřirozené aminokyseliny stejně jako výtěžek exprese cílového proteinu jsou výrazně zeslabeny v důsledku kompetice s přirozeným biosyntetickým

procesem. S použitím auxotrofních organismů, např. speciálně upravených kmenů *E. coli*, které mají blokovanou biosyntetickou dráhu pro danou aminokyselinu, však lze dosáhnout téměř 100% inkorporace nepřirozené aminokyseliny a vysokého výtěžku produkovaného proteinu (viz kapitola 4.2). Je na místě zmínit, že celková substituce přirozené aminokyseliny může vést k výraznému zpomalení růstu bakteriální kultury v důsledku ovlivnění funkce některých proteinů. Tento problém lze obejít postupným zvyšováním koncentrace analogu aminokyseliny v médiu až k úplnému nahrazení přirozené aminokyseliny daným analogem. Takto lze dosáhnout adaptace použitého bakteriálního kmene [Bacher 2001].

Jak bylo uvedeno v úvodu k této kapitole, prvním příkladem demonstrujícím úspěšné použití aminokyselinově-specifické inkorporace bez nutnosti genetické manipulace je náhrada Met za selenomethionin. Zavedení atomu Se do struktury proteinu je s výhodou využíváno k řešení fázového problému při vyhodnocování rentgeno-strukturních dat [Hendrickson 1990]. Methionin se jeví jako velmi vhodný kandidát díky nižší specifičtější methionyl-tRNA synthetasy. Je známa celá řada analogů methioninu, které byly inkorporovány do struktury různých proteinů. Dobrých výsledků bylo dosaženo i při použití dalších analogů aminokyselin (viz souhrnné publikace [Hendrickson 2004, Voloshchuk 2010]) a to nejen v bakteriálních ale i savčích buňkách. V mnoha případech však bylo nezbytné zvýšit hladinu intracelulární aminoacyl-tRNA synthetasy nebo byla použita geneticky modifikovaná varianta tohoto enzymu za účelem dosažení katalytické funkce vzhledem k použitému analogu. Zvýšení exprese přirozené aminoacyl-tRNA synthetasy lze dosáhnout transformací buněk vysokokopiovým plazmidem nesoucím gen pro produkci tohoto enzymu pod kontrolou konstitutivního či přirozeného promotoru. Tato technika byla využita např. k inkorporaci analogů Leu [Tang 2001], Val a Ile [Wang 2004].

Genetická modifikace vazebného místa enzymu [Tanrikulu 2009, Link 2006] nebo domény zodpovědné za eliminaci chybně acylované tRNA [Tang 2009] je dalším nástrojem k překonání vysoké substrátové specifity příslušné aminoacyl-tRNA synthetasy a dobře vyvinutého opravného mechanismu enzymu. Funkční mutanty mohou být navrhovány na základě dostupných strukturních dat a informací o reakčním mechanismu [Ibba 2000b] nebo mohou být selektovány z knihovny mutantů získané metodou řízené evoluce [Link 2006, Yoo 2007]. Např. studie zaměřené na leucyl-tRNA synthetasu odhalily, že threoninový zbytek v poloze 252 hraje důležitou roli při eliminaci chybně

acylované tRNA [Mursinna 2001] a jeho mutací bylo docíleno inkorporace několika analogů na místo leucinu (norleucinu, norvalinu, allylglycinu, homoallylglycinu homopropargylglycinu a 2-butynglycinu) [Tang 2002].

Hlavními přednostmi aminokyselinově-specifické inkorporace jsou: (i) vysoký zisk produkovaného proteinu s inkorporovaným analogem, (ii) téměř 100% výtěžek inkorporace, (iii) jednoduchost a snadná kontrola použitého expresního systému a (iv) udržení původní sekvence proteinu v důsledku zachování přísného kontrolního mechanismu buňky [Wang 2012]. Obecně lze předpokládat, že na rozdíl od místně-specifické inkorporace, celková substituce určité aminokyseliny může vést ke změnám ve struktuře a funkci cílových proteinů. Z tohoto hlediska je rozhodující vliv substituovaných aminokyselinových zbytků na biologickou funkci proteinu, volba použitého analogu aminokyseliny a jeho výskyt v sekvenci. Při využití této techniky za účelem strukturně-funkčních studií je tedy nezbytné vždy ověřit nativní chování proteinu s inkorporovaným analogem. Pro některé aplikace může být celková substituce přirozené aminokyseliny ve struktuře proteinu nevýhodná. Pokud však máme k dispozici mutantní variantu proteinu, která neobsahuje v sekvenci určitý aminokyselinový zbytek [Goltermann 2010] nebo byl ponechán pouze v místě, kam chceme zavést modifikaci, může být tato technika s výhodou použita i k cílené inkorporaci analogu aminokyseliny.

2.4 Modelové proteinové systémy

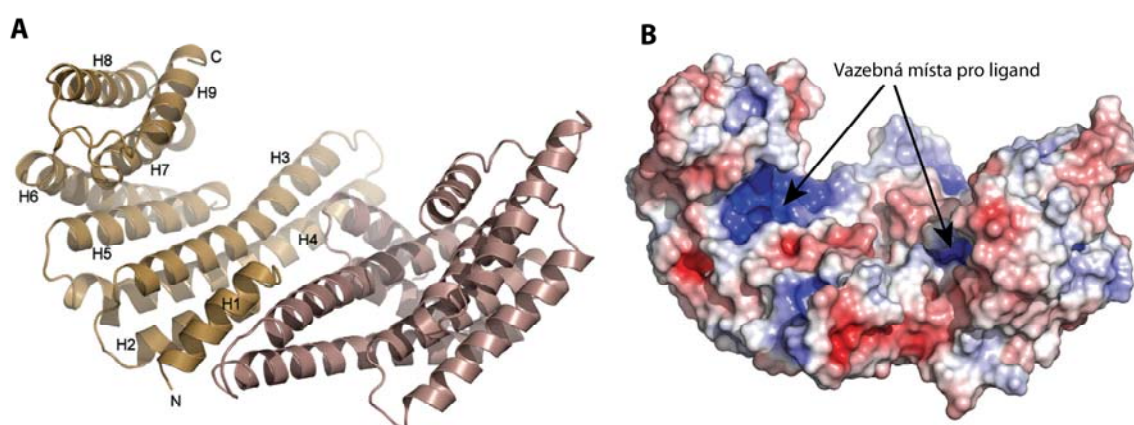
2.4.1 Regulační proteiny 14-3-3

Proteiny rodiny 14-3-3 se účastní regulace celé řady buněčných procesů: mimo jiné buněčné signalizace, apoptózy nebo suprese nádorového bujení. Mají svou úlohu i u různých neurodegenerativních onemocnění jako jsou Alzheimerova choroba, Creutzfeld-Jakobova choroba nebo Parkinsonova choroba [Pozuelo 2004, Shimada 2013].

Jedná se o vysoce konzervované molekuly kyselé povahy o velikosti 30 kDa, které jsou exprimovány v buňkách všech eukaryotních organismů. Jejich všestrannost tkví ve schopnosti vázat a ovlivňovat aktivitu řady funkčně velmi rozdílných substrátových proteinů. Jedinečná funkce těchto proteinů úzce souvisí s tvorbou stabilních homo či heterodimerních komplexů [Liu 1995, Xiao 1995].

Struktura monomeru je tvořena devíti antiparalelními α -helixy (H1-H9) a výsledky známých krystalových struktur sedmi lidských isoformů proteinu 14-3-3 ukazují, že

aminokyselinové zbytky helixu H1 a H2 jednoho monomeru interagují s aminokyselinami helixů H3 a H4 druhého monomeru za tvorby dimeru. Dimerní molekula připomíná tvarem otevřenou podkovu, ve které se nachází centrální vazebný kanál obsahující dva amfipatické vazebné žlábků (Obr. 11). Vnitřní konkávní část vazebného kanálu a dimerní rozhraní jsou značně konzervované, kdežto na vnějším konvexním povrchu byla zaznamenána variabilita aminokyselinových zbytků [Liu 1995, Xiao 1995, Yang 2006]. Dimerní struktura je charakteristická svou rigiditou, která zůstává z velké části zachována i po vazbě ligandu [Obšil 2011]. Z hlediska struktury je velmi zajímavá C-koncová část proteinu, která se vyznačuje vysokou flexibilitou a liší se v aminokyselinové sekvenci napříč isoformami. Bylo dokázáno, že C-konec hraje důležitou roli při regulaci vazebných vlastností proteinů 14-3-3 a to nejen díky zmíněné flexibilitě ale i díky přítomnosti negativně nabitých aminokyselinových zbytků [Truong 2002, Obšilová 2004, Šilhán 2004]. Experimenty naznačují, že C-koncová část proteinu může obsadit prostor vazebného žlábků, pokud není přítomen vazebný ligand. V případě 14-3-3zeta bylo zjištěno, že po odstranění C-konce proteinu se zvyšuje vazebná afinitu k některým substrátům. Naopak fosforylace v pozici 232 inhibuje interakci s ligandem a C-koncová část tak může hrát autoinhibiční roli [Šilhán 2004].

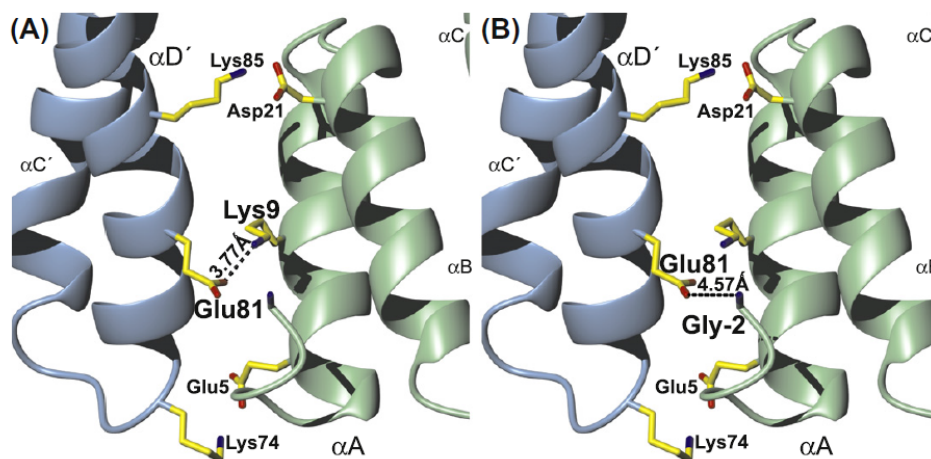


Obr. 11: Struktura proteinu 14-3-3. (A) Znázornění krystalové struktury dimeru lidské isoformy 14-3-3zeta. Monomery jsou barevně rozlišeny. Helixy jednoho monomeru jsou označeny H1-H9. (B) Reprezentace elektrostatického potenciálu na povrchu dimeru 14-3-3zeta s vyznačenými místy pro vazbu ligandu. Barevně je demonstrováno rozmezí elektrostatického potenciálu od -6 kT/e (červeně) do +6 kT/e (modře). Převzato z [Obšilová 2014].

Proteiny 14-3-3 rozpoznávají své interakční partnery na základě fosforylovaných serinových nebo threoninových sekvenčních motivů [Muslin 1996]. V současné době jsou známy tři hlavní typy – R[S/Φ][+]fSXP, RX[Φ/S][+]fSXP a fS-X1-2-COOH, kde fS značí fosfo-Ser (může být zaměněn za Thr), Φ aromatický zbytek, + bazický zbytek a X jakýkoli aminokyselinový zbytek [Yaffe 1997, Rittinger 1999, Ganguly 2005]. S ohledem na množství vazebných partnerů proteinů 14-3-3, však byla nalezena řada ligandů, fosforylovaných ale i nefosforylovaných, kteří se svými vazebnými motivy významně liší [Johnson 2010].

Mechanismus funkce proteinů 14-3-3 byl studován s využitím různých přístupů strukturní biologie na komplexech s mnoha rozdílnými ligandy (např. N-acetyltransferasa [Obšil 2001], C-terminální oblast rostlinné H⁺-ATPasy na plasmatické membráně [Ottmann 2007], transkripční faktor FOXO4 [Šilhán 2009], supresor p53 [Schumacher 2010], regulační doména tyrosin hydroxylasy (TH1R) [Obšilová 2008] nebo regulační G-protein RGS3 [Řežábková 2010]. Na základě získaných strukturních dat byly odvozeny tři funkční módy proteinů 14-3-3: (i) zprostředkování konformační změny cílového/regulovaného proteinu; (ii) maskování specifické sekvence či důležitého motivu na povrchu cílové molekuly; (iii) uspořádání dvou proteinů do specifické orientace a dostatečné blízkosti umožňující jejich vzájemnou interakci [Bridges 2004, Obšil 2011]. Detaily jednotlivých mechanismů nebyly v některých případech potvrzeny a přesná podstata strukturního mechanismu funkce proteinů 14-3-3 tak zatím zůstává neodhalena.

Jedním z projektů naší laboratoře je studium lidské isoformy 14-3-3zeta se zaměřením na tři hlavní strukturní oblasti, které ovlivňují funkci tohoto proteinu: N-koncová doména zodpovědná za tvorbu homodimeru, vazebný žlábek interagující s ligandovým proteinem za vzniku katalyticky aktivního komplexu a C-koncová smyčka zodpovědná za zvýšení specifity a selektivity k vazebným partnerům. Metodicky byla doposud aplikována technika chemického síťování pomocí EDC nebo H/D výměna v kombinaci s MS analýzou s vysokým rozlišením. Výsledky s homodimerním 14-3-3zeta ukázaly ve shodě s předchozími studiemi, že N-koncová část je v interakci s druhou podjednotkou přes α-helixy H3 a H4 společně s flexibilní smyčkou H3/H4. Na základě analýzy získaných cross-linků pomocí tandemové MS bylo navíc zjištěno, že k interakci mezi dvěma monomery přispívají iontové páry spojující Glu81 s Lys9 nebo s N-koncovou aminoskupinou [Haladová 2012] (Obr. 12 na str. 41).



Obr. 12: Rozhraní homodimeru lidského regulačního proteinu 14-3-3zeta. Vizualizace výsledků chemického síťování pomocí EDC v kombinaci s MS a MS/MS do popsanych rentgeno-strukturních dat. Znázornění iontových párů spojujících Glu81 s Lys9 (A) nebo Glu81 s N-koncovou aminoskupinou (B). Monomery jsou barevně rozlišeny. Helixy H1-H4 jsou zde označeny αA , αB , αC , αD . Převzato z [Haladová 2012].

Hlavním cílem předkládané práce bylo zavedení nové a unikátní metody proteinových foto-nanosond na modelové isoformě 14-3-3zeta (viz publikace v Příloze č. 1). Inkorporace foto-Met do struktury proteinu s následnou aktivací UV světlem za vzniku kovalentních cross-linků nám umožnila zachytit konformaci proteinu. Výhodou je vhodné rozmístění Met v sekvenci proteinu – Met1, Met22, Met26, Met78 v N-koncové části, Met121 ve vazebném žlábků a Met218 na C-konci. Kromě optimalizace nového postupu, studium regulačního proteinu 14-3-3 bude moci přinést nové strukturně biologické výsledky a přispět tak k objasnění regulačního mechanismu mnoha buněčných procesů.

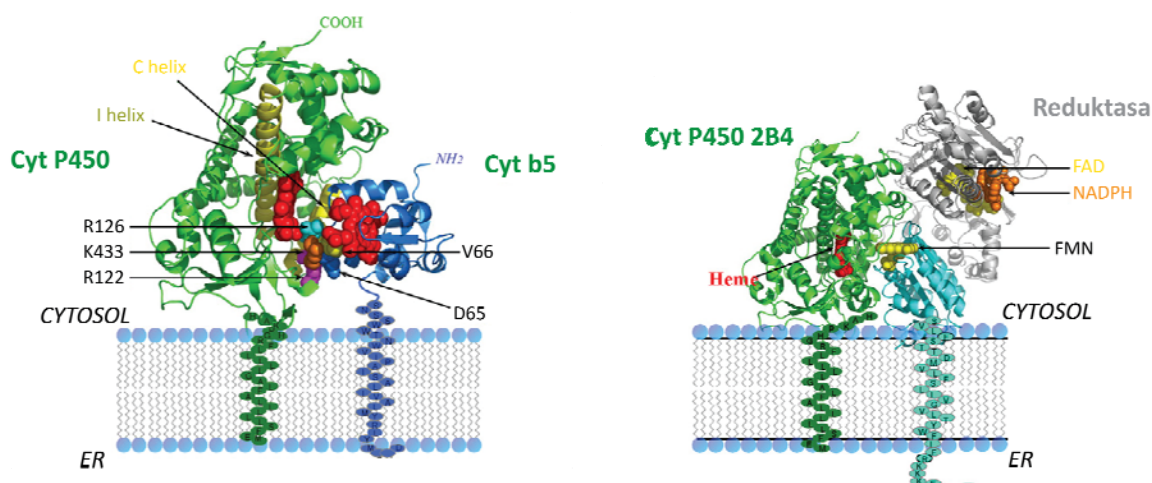
2.4.2 Cytochromy P450 a b5

Cytochromy P450 patří do všudypřítomné superrodiny proteinů, u které bylo identifikováno více než 6500 různých genů pro tyto enzymy u bakterií, hub, rostlin a živočichů [Dürr 2007]. V lidském genomu je kódováno 57 isoform cytochromu P450, které jsou zodpovědné za oxidaci tisíce různých látek chemické povahy [Nelson 2004]. Zhruba čtvrtina z nich jsou přitom klíčovými enzymy metabolismu xenobiotik v lidském organismu. V důsledku jejich působení může docházet k aktivaci nebo deaktivaci léčiv, detoxikaci xenobiotik, ale i k přeměně „neškodných“ sloučenin na látky toxické či dokonce karcinogenní [Guengerich 2005, Stiborová 2013]. Díky těmto výjimečným vlastnostem je studiu cytochromů P450 věnována velká pozornost.

Struktura cytochromů P450 je tvořena dvanácti α -helixy a čtyřmi β -listy a uprostřed molekuly je umístěn hem. Ten se na tzv. proximální straně molekuly koordinačně kovalentní vazbou přes svůj centrální atom železa váže na SH skupinu cysteinu. V tomto místě dochází k vazbě redoxního partnera a struktura je zde značně konzervovaná. Na tzv. distální straně, která je charakteristická svou vysokou variabilitou se váže molekula kyslíku a substrát [Johnson 2005].

Cytochromy P450 řadíme mezi oxygenasy se smíšenou funkcí. Vyskytují se především v endoplasmatickém retikulu (ER) jaterních buněk a nejčastěji zprostředkovávají hydroxylaci molekuly substrátu [Coon 1978]. Vzniklé hydroxylované substráty, kterými mohou být kromě cizorodých látek i endogenní molekuly, jsou lépe rozpustné a mohou tak být snáze vyloučeny z organismu. Mechanismus katalýzy cytochromů P450 je víceukrokový a dochází při něm k přenosu dvou elektronů na molekulu cytochromu P450 za vzniku hydroxylovaného produktu a vody. Děje se tak prostřednictvím cytochrom P450 reduktasy (CPR) a cytochromu b₅ (cyt b₅). Redukované formy koenzymů NADPH a NADH přitom fungují jako donory elektronů pro CPR a cyt b₅ reduktasu. CPR je schopna redukovat kromě cytochromu P450 i cyt b₅ [Enoch 1979]. Celý proteinový komplex, tzv. systém oxygenas se smíšenou funkcí (MFO, z angl. Mixed Function Oxidases), je lokalizován na membráně ER a ukotvení v membráně je klíčové pro jeho fyziologickou funkci (Obr. 13 na str. 43). Kromě membrány ER se cytochromy P450 vyskytují i v membráně mitochondrií a v podstatně menší míře byly detekovány i ve vnější jaderné membráně, peroxizomech, plazmatické membráně nebo v Golgiho komplexu [Seliskar 2007]. Zastoupení redoxních partnerů cytochromu P450 v ER se významně liší. Zatímco na jednu molekulu CPR připadne 10-20 molekul cytochromu P450, cytochromy b₅ a P450 jsou přítomny přibližně ve stejném poměru [Dürr 2007].

Cytochrom b₅ se v organismu vyskytuje ve dvou formách - jako rozpustný protein v erytrocytech nebo tzv. mikrosomální cyt b₅ vázaný na membránu ER jaterních buněk [Douglas 1978]. Obě formy obsahují hemovou skupinu a mohou se vyskytovat jak v redukovaném tak oxidovaném stavu. Struktura mikrosomálního cyt b₅ je charakteristická solubilní doménou s navázaným hemem [Muskett 1996, Durley 1996] a hydrofóbní, α -helikální transmembránovou kotvou na C-konci [Vergères 1995]. Obě domény jsou vzájemně propojeny krátkým peptidovým řetězcem (15 aminokyselinových zbytků), který má pravděpodobně společně s membránovou kotvou důležitou úlohu při interakci cyt b₅ s cytochromem P450 [Clarke 2004, Yamamoto 2013].



Obr. 13: Lokalizace systému MFO na membráně ER. Model interakce cytochromu P450 a b5 (A). Model komplexu cytochromu P450 a cytochrom P450 reduktasy (B). Převzato z [Im 2011].

Na modelové isoformě králíčího cytochromu P450 2B4 (dále jen P450 2B4) bylo zjištěno, že cyt b5 může jak stimulovat tak inhibovat jeho aktivitu [Schenkman 2003, Zhang 2005]. Při nízké molární koncentraci cyt b5 oproti CPR, dochází ke stimulaci. Rychlost katalýzy v přítomnosti cyt b5 je 10 – 100krát vyšší ve srovnání se zapojením CPR, kdy je katalýza zpomalena tvorbou meziproduktů s dlouhým poločasem života [Zhang 2003]. V případě cyt b5 v důsledku okamžité spotřeby NADPH nedochází k tvorbě vedlejších reakčních produktů ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^-$) a roste tak účinek katalýzy [Zhang 2007]. Předpokládá se, že P450 2B4 se liší svou konformací v přítomnosti cyt b5 a CPR [Hlavica 2001]. Při vysoké koncentraci cyt b5 může být aktivita P450 2B4 naopak inhibována. Cyt b5 se váže na P450 2B4, čímž brání navázání CPR a iniciaci katalýzy. CPR se sice váže do jiného místa než cyt b5, avšak díky lokalizaci obou vazebných míst na proximální straně P450 2B4 není současná interakce pravděpodobně umožněna [Bridges 1998, Zhang 2007]. V případě, že je inhibiční a stimulační efekt cyt b5 v rovnováze, aktivita P450 2B4 není ovlivněna. U některých isoform cytochromu P450 bylo ukázáno, že kromě rychlosti katalýzy může cyt b5 ovlivňovat i spektrum vznikajících reakčních produktů a to jak z hlediska kvantitativního tak kvalitativního [Kotrbová 2011].

Z výše uvedeného je zřejmé, že z hlediska funkce jde o velmi složitý systém. Dynamika tohoto membránového komplexu a studium interakcí cytochromu P450 s jeho redoxními partnery jsou klíčovými aspekty k objasnění role při metabolismu xenobiotik.

Strukturní studium je však značně ztíženo lokalizací v membráně a zmíněnou komplexností systému. Jedním z cílů předkládané práce bylo rozšíření doposud získaných strukturních dat s využitím síťovacích technik (chemické síťování s EDC nebo síťování pomocí foto-Met) v kombinaci s MS (viz publikace v Příloze č. 2 a č. 3). Detailně se u nás v laboratoři zabýváme interakcí nejen katalytické domény ale i membránové části (lokalizace Met126 a Met131) a spojovacího peptidu (Met96) králičího P450 2B4 s cyt b5 (v sekvenci neobsahuje ani jeden Met).

3 CÍLE PRÁCE

- 1) Zavedení nového metodologického přístupu síťování pomocí foto-aktivovatelného analogu aminokyseliny a následná MS analýza za účelem studia protein-proteinových interakcí
 - a) využití nového postupu na modelové interakci v homodimeru lidského regulačního proteinu 14-3-3zeta
 - b) optimalizace inkorporace foto-aktivovatelných analogů aminokyselin do sekvence 14-3-3zeta

- 2) Charakterizace membránového komplexu králíčího P450 2B4 a cyt b5 pomocí síťovacích technik
 - a) mapování interakce mezi katalytickými doménami P450 2B4 a cyt b5 s využitím chemického síťování pomocí EDC a MS analýzy
 - b) síťování P450 2B4 a cyt b5 (studium vzájemné interakce membránových domén) pomocí foto-Met inkorporovaného do struktury cyt b5 a určení stechiometrie vytvořených heterooligomerních komplexů

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Aplikace nové síťovací techniky pomocí foto-Met v kombinaci s MS ke studiu protein-proteinových interakcí: využití modelové interakce v homodimeru lidského regulačního proteinu 14-3-3zeta

Síťování pomocí foto-aktivovatelného analogu methioninu v kombinaci s MS a MS/MS analýzou se jeví jako velmi vhodná technika ke studiu struktury a interakcí proteinů za nativních podmínek v roztoku. Aplikace tohoto přístupu byla demonstrována na modelové interakci mezi podjednotkami homodimeru 14-3-3zeta. Získané výsledky byly představeny v publikaci (viz Příloha č. 1):

Ptáčková, R., Ječmen, T., Novák, P., Hudeček, J., Stiborová, M., Šulc, M.: The application of an emerging technique for protein-protein interaction interface mapping: the combination of photo-initiated cross-linking protein nanoprobe with mass spectrometry, International Journal of Molecular Sciences 15, 9224-41 (2014).

S využitím techniky založené na *in vivo* aminokyselinově-specifické inkorporaci nepřirozených aminokyselin do sekvence proteinu (viz kapitola 2.3.2) byly produkovány dimerní 14-3-3zeta WT a monomerní mutant 14-3-3zeta S58D s inkorporovaným foto-Met. U 14-3-3zeta S58D náhrada serinu za záporně nabitý zbytek kyseliny asparagové simuluje fosforylaci hydroxylové skupiny v poloze 58, ke které dochází za fyziologických podmínek a vede k rozpojení katalyticky aktivního homodimerního komplexu. K substituci přirozené aminokyseliny během exprese rekombinantních proteinů v *E. coli* docházelo v důsledku tolerance buněčného translačního mechanismu a to na základě strukturní podobnosti foto-Met s přirozeným Met (viz Obr. 6 na str. 27) a díky nižší specifitě methionyl-tRNA synthetasy. Inkorporace foto-Met do struktury studovaných proteinů byla sledována po trypsinizaci proteinu pomocí MALDI-TOF MS díky rozdílu 19.972 hmotnostních jednotek mezi peptidy s inkorporovaným foto-Met a přirozeným Met (viz schéma na Obr. 10 na str. 36). Míra inkorporace (přibližně 60%) byla stanovena na základě poměru intenzit dvojice signálů ve spektru, které odpovídaly značenému a neznačenému (přirozenému) peptidu.

Purifikace proteinů byla provedena dle standardního protokolu [Obšilová 2004, Haladová 2012] z bakteriálního lyzátu po 2 hodinách exprese indukované pomocí IPTG.

Úspěšnost purifikačních kroků byla kontrolována pomocí SDS-PAGE, identita obou proteinů a odštěpení histidinové kotvy z N-konce účinkem thrombinu byly potvrzeny metodou MS. Nativní chování výsledných proteinových preparátů s inkorporovaným foto-Met – tvorba homodimeru 14-3-3zeta WT a monomerní charakter 14-3-3zeta S58D bylo prokázáno pomocí nativní elektroforézy. Získané proteiny byly *in vitro* síťovány v roztoku za fyziologických podmínek. Po ozáření UV světlem docházelo k aktivaci diazirinové funkční skupiny foto-Met a k nespecifické vazbě vytvořeného nestabilního biradikálu na aminokyselinový zbytek vzdálený max. 5 Å ve trojrozměrné struktuře proteinu (viz schéma na Obr. 7 na str. 27). Produkty síťovací reakce – kovalentně spojený dimer 14-3-3zeta WT, monomery 14-3-3zeta WT a 14-3-3zeta S58D byly analyzovány s využitím tzv. „bottom-up“ přístupu (viz Obr. 8 na str. 30).

Pomocí MALDI-TOF MS byly identifikovány tři signály o hodnotách m/z 1342,744; 1470,842 a 1998,030 charakteristické pro homodimer 14-3-3zeta WT. V případě obou analyzovaných monomerů tyto signály nebyly detekovány a můžeme tedy předpokládat, že se jedná o intermolekulární cross-linky. Za účelem přesné identifikace kovalentně spojených peptidů byla použita FTMS a to buď v kombinaci s MALDI a nebo v kombinaci s ESI, kdy byl vzorek před nástřikem separován s využitím kapalinové chromatografie na obrácené fázi. Naměřená data byla porovnána s databází teoretických cross-linků. Možné produkty síťovací reakce, resp. odpovídající hodnoty m/z , byly generovány na základě součtu teoretických hodnot m/z jakýchkoli dvou peptidů vzniklých trypsinizací 14-3-3zeta WT a odečtením hodnoty 19,972 v důsledku síťování účinkem foto-Met. Díky MS s vysokým rozlišením byly detekovány i signály pro intramolekulární cross-linky a tzv. mono-linky, kdy po ozáření foto-Met UV světlem docházelo k terminaci karbenového biradikálu za vzniku dvojné vazby. Tyto signály byly vyřazeny ze souboru analyzovaných dat. Hodnoty m/z odpovídající intermolekulárním cross-linkům v homodimeru 14-3-3zeta a sekvence identifikovaných peptidů jsou uvedeny v Tabulce č. 1 na str. 48.

S cílem určit interagující aminokyselinové zbytky byly získané signály dále analyzovány pomocí tandemové MS s využitím instrumentalizace MALDI-TOF/TOF. Při použití hodnot m/z 1342,7457 a 1470,8408 jako prekurzorových iontů byla na základě charakteristických spekter s výskytem signálů pro komplementární y- a b- ionty stanovena interakce mezi foto-Met78 a Gln8 (Obr. 14 A na str. 49). V případě třetího identifikovaného signálu (1998,0186) jsou možné dva typy cross-linků

v důsledku přítomnosti Met resp. foto-Met v obou interagujících peptidech. V této souvislosti je na místě zmínit, že fotolýza byla prováděna za různých podmínek - v přítomnosti či nepřítomnosti glycerolu (10% v/v) a soli (150 mM NaCl). Zatímco sůl neměla žádný vliv na výsledná MS/MS spektra, v případě glycerolu byl pozorován zajímavý efekt avšak pouze při MS/MS analýze signálu o m/z 1998,0186. V přítomnosti glycerolu byly oproti fragmentům charakteristickým pro výše uvedenou interakci mezi foto-Met78 a Gln8 navíc pozorovány i fragmenty s nižší intenzitou odpovídající interakci foto-Met1 s Gln77 (Obr. 14 B na str. 49). Tato interpretace je ale zpochybněna výskytem dalších fragmentů, které nejsou charakteristické ani pro jednu ze zmíněných interakcí.

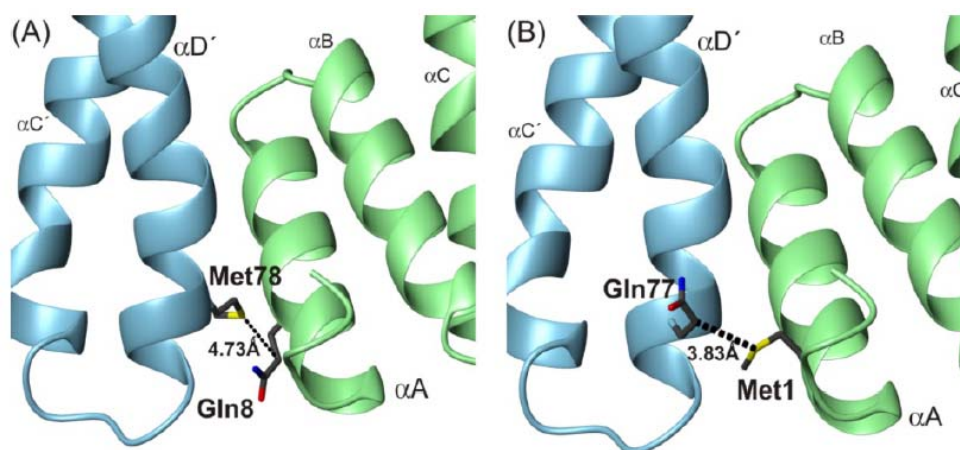
Tab. 1: Identifikace intermolekulárních cross-linků v homodimeru 14-3-3zeta pomocí MS s vysokým rozlišením.

$[M + H]^+$ experimentální	Chyba [ppm]	14-3-3zeta (1)	14-3-3zeta (2)
1342,7457*	1,9	4-9	76-80
		K.NELVQK.A	K.QQfMAR.E
1470,8408*	1,8	4-9	76-80
		K.NELVQK.A	K.KQQfMAR.E
1998,0186 [§] /1998,0234*	0,2 [§] /2,2*	(-2)-9	76-80
		.GSHMDKNELVQK.A	K.QQfMAR.E

Hodnoty naměřené pomocí MALDI-FTICR MS jsou označeny symbolem * a hodnoty získané pomocí LC-ESI-FTICR symbolem [§]. Interagující aminokyselinové zbytky jsou v sekvenci jednotlivých peptidů podtrženy, fM značí foto-Met.

Detailnější analýzou výsledků LC-FTICR MS bylo ukázáno, že zkoumaný produkt síťování je eluován společně s peptidem (12)LAEQAERYDD(fM)AAC(fM)K(27) o m/z 1881,8459 (v případě náhrady jednoho z Met za foto-Met) a 1861,8735 (při substituci obou Met za foto-Met) nebo 1995,8791, kdy docházelo k vazbě jednoho z foto-Met na molekulu sodného aduktu glycerolu. Peptid o m/z 1881,8459 představuje potenciální intramolekulární cross-link. V MS/MS spektru tohoto peptidu však byly patrné pouze signály odpovídající terminaci karbenového radikálu foto-Met za vzniku dvojné vazby. Tento fakt poukazuje na přístupnost přítomných Met zbytků (Met22 a Met26) rozpouštědla a podporuje tak možnost zmíněné interakce s glycerolem za vzniku modifikovaného peptidu o m/z 1995,8791. Nejedná se tedy o intramolekulární cross-link a navíc v získaném MS/MS spektru nebyly identifikovány fragmenty potvrzující potenciální interakci foto-Met1 s Gln77, které byly nalezeny v případě studovaného

signálu o m/z 1998,0186. Bohužel se nepodařilo najít vhodné podmínky pro separaci ko-eluovaných peptidů. Interakce Met1-Gln77, která byla detekována pouze v roztoku s obsahem glycerolu je tedy velmi diskutabilní. Jedním z vysvětlení tohoto jevu může být vliv glycerolu na flexibilitu N-koncové části proteinu (zapojení interakce Met1-Gln77 při tvorbě homodimeru). Druhým pravděpodobnějším vysvětlením je modifikace Met22 a Met26 v N-koncové části proteinu, která vypovídá o přístupnosti této části molekuly solventu a nedochází přitom k diskutované intermolekulární interakci. Při interpretaci MS/MS spektra může hrát roli kromě glycerolu a kontaminujících peptidů i přítomnost tří aminokyselinových zbytků (-2)GSH(0), které zůstaly v sekvenci proteinu po odštěpení histidinové kotvy. U předchozích experimentů (nativní elektroforéza, H/D výměna a síťování pomocí EDC v kombinaci s MS) nebyla v této souvislosti detekována žádná nespecifická interakce.



Obr. 14: Identifikace nových kontaktů aminokyselin v interakční doméně homodimeru lidského regulačního proteinu 14-3-3zeta. Vizualizace výsledků síťování pomocí foto-Met v kombinaci s MS a MS/MS do popsáných rentgeno-strukturních dat. Znázornění nově nalezené interakce Met78-Gln8 (A) nebo potenciální interakce Met1-Gln77 (B). Monomery jsou barevně rozlišeny. Helixy H1-H4 jsou zde označeny αA , αB , αC , αD .

Výsledky ukázaly ve shodě s předchozími studiemi, že N-koncová část jedné podjednotky (α -helix H1) je v interakci s druhou podjednotkou přes α -helix H4. Dříve nalezené iontové páry Glu5-Lys74, Arg18-Glu89 a Asp21-Lys85 [Gardino 2006, Yang 2006] společně s Glu81-Lys9 nebo Glu81-N-koncová aminoskupina [Haladová 2012] rovněž podporují vypovídající hodnotu získaných výsledků.

4.2 Optimalizace postupu pro inkorporaci foto-aktivovatelných analogů aminokyselin do struktury proteinů během rekombinantní exprese v bakteriálních buňkách

Modifikace proteinů činidly pro chemické zesíťení je často používanou metodou ke studiu protein-proteinových interakcí. Tato technika umožňuje fixovat původní nekovalentní vazby ve struktuře proteinu nebo v komplexu proteinů, které mohou být identifikovány pomocí MS analýzy (viz kapitola 2.2.3). Využití foto-aktivovatelných aminokyselin jako síťovacích činidel se jeví jako velmi výhodné z několika důvodů. K iniciaci síťování dochází účinkem UV světla, z hlediska reakčního mechanismu se tedy jedná o foto-reaktivní cross-linkery, jejichž předností je vysoká rychlost síťování (řádově jednotky minut). Diazirinová funkční skupina činidla se po aktivaci UV zářením rozpadá za vzniku velmi reaktivního karbenového biradikálu, který se kovalentně váže na jakýkoli aminokyselinový zbytek ve svém blízkém okolí. Foto-aktivovatelné analogy aminokyselin tak řadíme mezi nespecifické cross-linkery (reakce není omezena pouze na určitou skupinu v postranním řetězci aminokyseliny) s „nulovou délkou“ (vazba do vzdálenosti 5 Å bez zabudování další skupiny mezi spojované části molekul). Výhodou kovalentní vazby na krátkou vzdálenost je zachování terciární struktury studovaných bílkovin. Díky zabudování síťovacího činidla přímo do struktury proteinu navíc tato technika není omezena reakčními podmínkami, které jsou při použití některých činidel limitujícím faktorem z hlediska zachování nativního stavu proteinů.

Pro aplikaci tohoto experimentálního přístupu je však klíčová dostatečná inkorporace nepřírozené aminokyseliny do sekvence proteinu. K zabudování strukturního analogu aminokyseliny může docházet *in vivo* během rekombinantní exprese proteinu (viz kapitola 2.3). Nejjednodušší cestu představuje substituce přirozené aminokyseliny foto-aktivovatelným analogem v důsledku tolerance translačního mechanismu buňky. Methionin se z tohoto hlediska jeví jako velmi vhodný kandidát díky nižší specifitě methyonyl-tRNA synthetasy [Datta 2004].

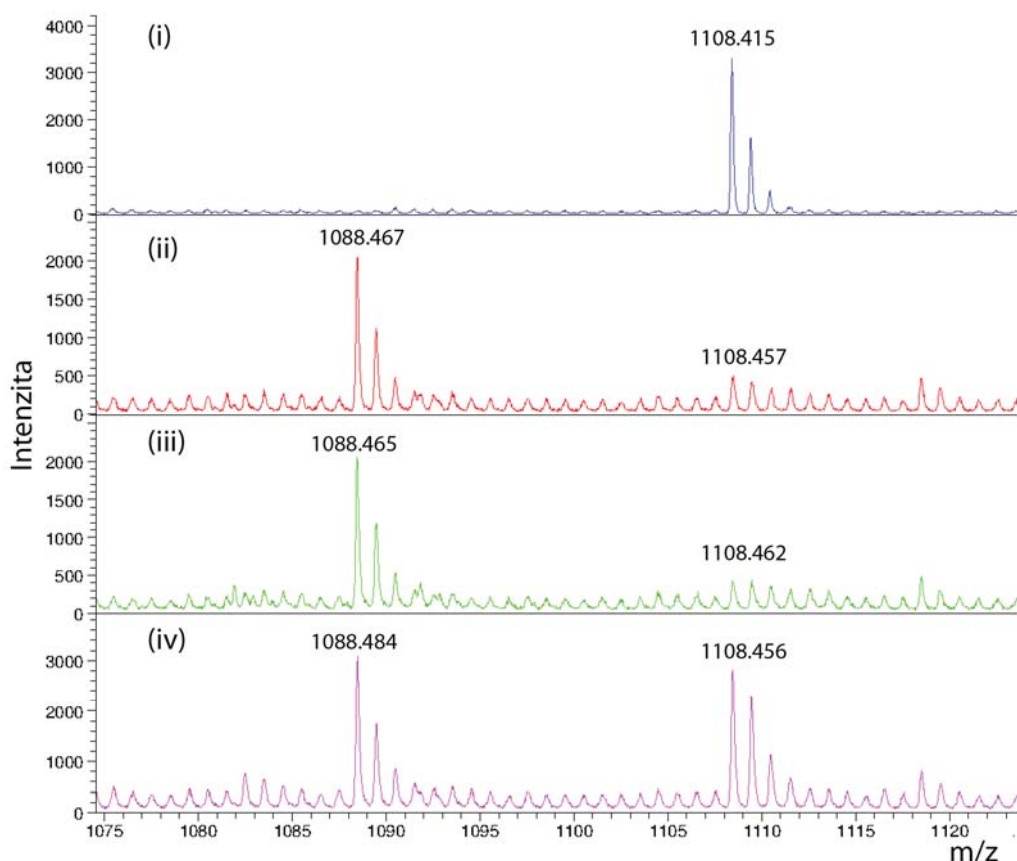
V publikacích prezentovaných v rámci této práce (viz Příloha č. 1 a č. 3) byly produkovány proteiny s inkorporovaným foto-Met v buňkách *E. coli* BL-21 DE3 Gold. Jak v případě rozpustného 14-3-3zeta tak u membránově vázaného cytochromu b5 byla inkorporace dostatečná (více než 50% Met bylo nahrazeno za foto-Met) a proteiny byly úspěšně zesíťovány a získané produkty dále analyzovány. Oba diskutované proteiny mají

poměrně nízkou molekulovou hmotnost (do 30 kDa), technika byla proto testována i na proteinu o molekulové hmotnosti přibližně 180 kDa. Jedná se o adenylát cyklázový toxin označovaný CyaA, který je jedním z klíčových faktorů virulence bakterie *Bordetella pertussis* (původce černého kašle) [Goodwin 1990, Khelef 1992]. I v případě CyaA byla inkorporace foto-Met úspěšná a tím tento metodický přístup nabývá na důležitosti ve srovnání s velikostí studovaných proteinů klasickými metodami strukturní biochemie. Je ale nutno zmínit, že míra inkorporace se liší s každým provedeným experimentem, což pravděpodobně souvisí se zvoleným postupem (viz schéma na Obr. 10 na str. 36). Jedním z vysvětlení tohoto jevu může být zbytková koncentrace methioninu při expresi proteinu v důsledku nedostatečného odmytí LB média z narostlé buněčné kultury. Vlastní syntéza methioninu je blokována přidavkem určitých aminokyselin do MM-M9 [Egli 2010] a dalším možným důvodem může být tedy různá úspěšnost inhibice této biosyntetické dráhy.

Za účelem optimalizace postupu pro inkorporaci foto-Met do struktury proteinů byl k produkci 14-3-3zeta využit kmen *E. coli* K-12 s deletovanou dráhou pro syntézu methioninu. Inkorporace foto-Met byla sledována pomocí MALDI-TOF MS (viz kapitola 4.1 a Obr. 10 na str. 36). Získané výsledky, které zatím nebyly publikovány, jsou znázorněny na Obrázku 15 na str. 52. Z výřezu hmotnostního spektra je zřejmé, že s využitím auxotrofního bakteriálního kmene bylo po třech hodinách produkce dosaženo téměř 100% inkorporace foto-Met do sekvence 14-3-3zeta a to jak při koncentraci 30 mg/L tak při koncentraci 90 mg/L. Dle očekávání, pokud byl do média přidán kromě foto-Met (30 mg/L) i Met o koncentraci 1 mg/L (1% běžně používané koncentrace) docházelo pouze přibližně k 50% inkorporaci foto-aktivovatelného analogu. Je tedy zřejmé, že i velmi nízká koncentrace přirozené aminokyseliny vede k výraznému snížení účinnosti inkorporace a to i při použití auxotrofního kmene.

Je zajímavé, že v případě foto-Leu se s využitím výše popsaného postupu nepodařilo dosáhnout stejných výsledků jako s foto-Met. Pomocí SDS-PAGE byla ověřena produkce proteinu za daných podmínek a to i v buňkách s deletovanou dráhou pro syntézu leucinu, v analyzovaném spektru však nebyly detekovány signály odpovídající peptidům s inkorporovaným foto-Leu. Možným vysvětlením pro syntézu proteinu v auxotrofním kmeni jsou vzájemné přeměny aminokyselin, díky kterým mohou bakterie získat chybějící leucin. To že foto-Leu nebyl zabudován do sekvence produkovaného proteinu je pravděpodobně dáno vysokou substrátovou specifitou leucyl-tRNA synthetasy a dobře

vyvinutým opravným mechanismem enzymu [Chen 2000]. K překonání tohoto problému bude tedy nezbytné zavést další optimalizační kroky nebo přejít k rozsáhlejší genetické manipulaci použitého expresního systému (např. zvýšení exprese přirozené leucyl-tRNA synthetasy, genetická modifikace vazebného místa enzymu či domény zodpovědné za eliminaci chybně acylované tRNA).



Obr. 15: Inkorporace foto-Met do sekvence 14-3-3zeta. Míra inkorporace byla sledována po trypsinizaci proteinu pomocí MALDI-TOF MS na základě rozdílu v hodnotě m/z pro peptid s přirozeným Met (1108,5) a foto-Met (1088,5). Znáznorněn je pouze výřez MS spektra v rozsahu hodnot m/z 1075-1130. Protein byl produkován v buňkách *E. coli* K-12 s deletovanou dráhou pro syntézu methioninu po dobu tří hodin v MM-M9 s přidavkem Met 100 mg/L (i), foto-Met 30 mg/L (ii) foto-Met 90 mg/L (iii) nebo Met 1 mg/L a foto-Met 30 mg/L (iv).

4.3 Kombinace chemického síťování pomocí EDC a MS analýzy k mapování interakce cytochromu P450 2B4 a cytochromu b5

Membránové hemoproteiny cytochrom P450 a cytochrom b5 společně s flavoproteinem NADPH:P450 reduktasou tvoří systém oxygenas se smíšenou funkcí, který se významnou měrou podílí na metabolismu xenobiotik v organismu (viz kapitola 2.4.2). Studium dynamických vlastností a vzájemných proteinových interakcí v systému MFO je klíčové pro pochopení mechanismu funkce tohoto membránového komplexu. S využitím chemického síťování pomocí činidla EDC a MS s vysokým rozlišením byla studována interakce mezi katalytickými doménami cytochromu P450 2B4 (P450 2B4) a cytochromu b5 (cyt b5) a výsledky získané na základě tohoto experimentálního přístupu byly představeny v publikaci (viz Příloha č. 2):

Šulc, M., Ječmen, T., Šnajdrová, R., Novák, P., Martínek, V., Hodek, P., Stiborová, M., Hudeček, J.: Mapping of interaction between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5: the first evidence of two mutual orientations, *Neuroendocrinology Letters* 33 Suppl. 3, 41-7 (2012)

Studované proteiny byly purifikovány z mikrosomů získaných z homogenátu králíčích jater dle dříve publikovaného protokolu [Šulc 2004, Šulc 2010]. Čistota proteinů během jednotlivých izolačních kroků byla sledována pomocí SDS-PAGE a identita získaných preparátů – P450 2B4, cyt b5 a NADPH:P450 reduktasy byla ověřena s využitím MS analýzy. Rekonstituce membránového systému byla provedena *in vitro* pomocí DLPC a aktivita komplexu proteinů potvrzena na základě specifické O-depentylasové aktivity P450 2B4 vzhledem k 7-pentoxoresorufinu [Šulc 2010].

Na dříve popsaném rekonstituovaném komplexu P450 2B4 a NADPH:P450 reduktasy bylo prokázáno, že za reakčních podmínek nezbytných pro funkci zvoleného cross-linkeru (pyridinový pufr a pH 6,5) nedochází ke ztrátě aktivity studovaného komplexu. V přítomnosti pyridinového pufru o pH 6,5 však byla stanovená aktivita přibližně 1,5krát nižší ve srovnání s použitím fosfátového pufru o pH 7,4. Stejným postupem byla testována i aktivita systému s přidaným cytochromem b5 a ve shodě s literaturou bylo ukázáno, že při použití molárního poměru P450 2B4 a cyt b5 1:1 docházelo ke stimulaci aktivity P450 2B4 (162% aktivity v porovnání s komplexem bez cyt b5 v pyridinovém pufru o pH 6,5). Při použití dvojnásobku nebo čtyřnásobku molární

koncentrace cyt b5 byl naopak zaznamenán pokles aktivity a to pravděpodobně v důsledku kompetice cyt b5 a přítomné reduktasy o vazebné místo na P450 2B4 (82% v případě molárního poměru 1:2 a 44% pro poměr 1:4).

Síťování bylo provedeno ve výše popsaném *in vitro* rekonstituovaném systému s využitím činidla EDC a různé koncentrace soli po dobu 10-ti hodin při 37°C. Pomocí SDS-PAGE bylo ukázáno, že tvorba cross-linků není ovlivněna přítomností NADPH:P450 reduktasy a výsledně tedy byla analyzována směs obsahující pouze P450 2B4 a cyt b5 v optimálním ekvimolárním poměru. Bylo ukázáno, že s rostoucí koncentrací NaCl klesá aktivita P450 2B4, na vznik cross-linků však různá koncentrace soli neměla vliv. Můžeme tedy předpokládat, že na tvorbě komplexu se kromě interakcí mezi opačně nabitými zbytky postranních řetězců aminokyselin může podílet i hydrofobní efekt. Velká plocha interakční domény heterodimeru (2050 ± 80 Å) potvrzuje pravdivost tohoto předpokladu. Lze usuzovat, že v důsledku rozsáhlého působení van der Waalových sil jsou přítomné iontové interakce chráněny před kontaktem s rozpouštědlem a komplex je tak stabilizován i v roztoku s vysokou iontovou silou.

Produkty síťovací reakce – kovalentně spojený heterodimer, cytochrom P450 2B4 a b5 byly analyzovány s využitím tzv. „bottom-up“ přístupu (viz Obr. 8 na str. 30). Pomocí MS s vysokým rozlišením (LC-FTICR MS a MALDI-TOF/TOF MS, kdy byl vzorek před analýzou separován pomocí HPLC) byly identifikovány čtyři intermolekulární cross-linky charakteristické pro heterodimer P450 2B4 a cyt b5 (viz Tab. 2 na str. 55). Možné produkty síťovací reakce, resp. odpovídající hodnoty m/z , byly generovány na základě součtu všech teoretických hodnot m/z peptidů vzniklých trypsinizací jednoho a druhého proteinu a odečtením hodnoty m/z pro molekulu vody, která byla eliminována v důsledku síťování účinkem EDC (viz reakční schéma síťování na Obr. 5 na str. 26).

Výsledky *in silico* homologního modelování ukázaly, že na základě nalezených cross-linků nelze předpokládat pouze jediné možné uspořádání studovaného heterodimeru. Všechny čtyři identifikované aminokyselinové zbytky P450 2B4 účastníci se sledované interakce jsou lokalizovány na proximální straně molekuly, kde dochází k vazbě redoxního partnera v blízkosti hemové skupiny cytochromu jak bylo popsáno dříve [Johnson 2005]. První navržené uspořádání, které je ve shodě s publikovanými daty umožňuje obě předpokládané funkce cyt b5 [Bonfils 1981, Hlavica 1984] - alosterickou modulaci metabolické aktivity P450 2B4 a zprostředkování přenosu elektronů na skupinu hemu P450 2B4 prostřednictvím argininového zbytku v poloze 133 [Šulc 2008]

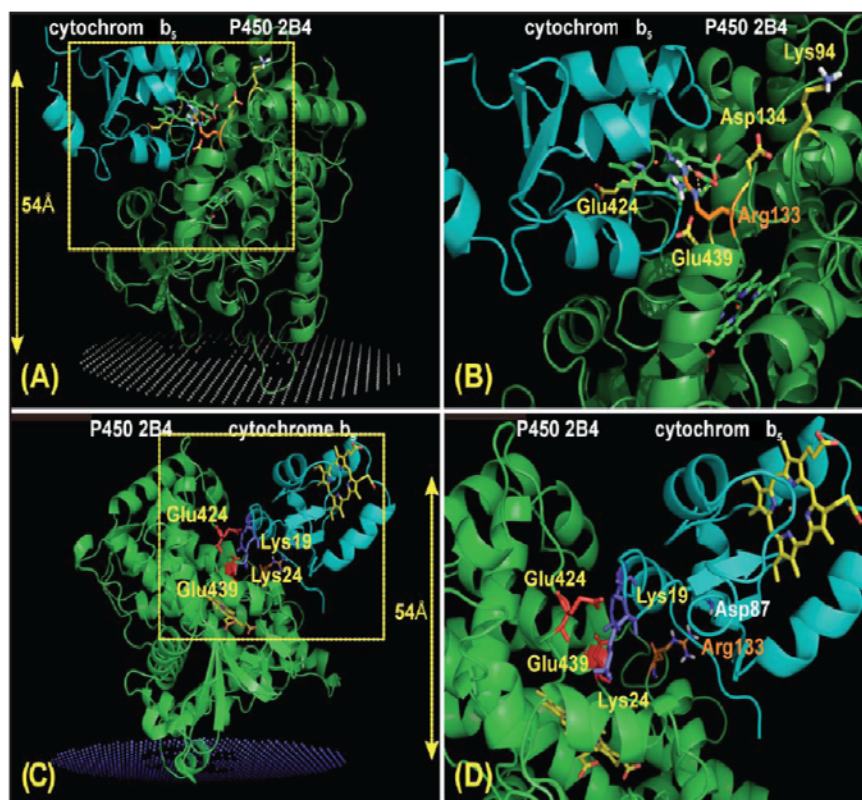
(viz Obr. 16 A, B na str. 56). Orientace komplexu vzhledem k membráně byla dedukována na základě informací dostupných v databázi [Lomize 2006] a s využitím získaných výsledků.

Tab. 2: Identifikace cross-linků v heterodimerním komplexu cytochromu P450 2B4 a cytochromu b5 pomocí MS s vysokým rozlišením.

[M + H]⁺ experimentální	Chyba [ppm]	Peptid P450 2B4	Peptid cyt b5
2479,2371	0,4	134-151	8-10
		DFGMGKRSVEERIQEEAR	DVK
2504,2917	1,6	126-140	19-24
		RFSLATMRDFGMGKR	KHNHSK
2657,4001	0,1	134-140	19-33
		DFGMGKR	KHNHSKSTWLILHHK
1719,9058	1,0	435-443	19-24
		IC ^(CAM) LGEGIAR	KHNHSK
3117,5918	1,2	423-434+OX-M	20-33
		NEGFM ^(OX) PFSLGKR	HNHSKSTWLILHHK

Interagující aminokyselinové zbytky jsou v sekvenci jednotlivých peptidů podtrženy, M^(OX) značí oxidovaný Met, C^(CAM) značí karbamidomethylovaný Cys v důsledku modifikace disulfidických vazeb pomocí činidel TCEP a IAA.

Pokud by však současně docházelo k interakcím Glu424(P450 2B4)-Lys24(cyt b5) a Glu439(P450 2B4)-Lys19(cyt b5), lze usuzovat o další možné orientaci cytochromu b5. V tomto uspořádání, které je znázorněno na Obr. 16 C, D na str. 56 je hemová skupina cyt b5 odvrácena od proximální strany P450 2B4 a nemůže tedy docházet k transferu elektronů, ale pouze k modulaci aktivity v důsledku indukce konformačních změn. Je možné, že toto uspořádání zachycuje pouze určitou část komplikovaného membránového systému MFO. Kromě zde probíraného heterodimeru byl jako produkt síťování s využitím SDS-PAGE detekován i signál, jehož hmotnost odpovídala dvěma molekulám P450 2B4 a jedné molekule cyt b5. S využitím MS byla potvrzena přítomnost obou studovaných proteinů v proužku gelu, detailnější analýza však nebyla možná vzhledem k nízkému výtěžku cross-linku. Na základě tohoto výsledku lze ale predikovat multimerní charakter komplexu cytochromu P450 2B4 a b5.



Obr. 16: Znázornění trojrozměrného uspořádání heterodimerního komplexu cytochromu P450 2B4 a cytochromu b₅. Orientace P450 2B4 a cyt b₅ navržená na základě cross-linkovaných aminokyselinových zbytků Asp134, Lys139, Glu424 a Glu439 P450 2B4 (A) a detailní pohled (B), kde je přerušovanou čarou vyznačena interakce hemové skupiny cyt b₅ (zeleně) s Arg 133 P450 2B4 (oranžově). Struktura komplexu založená na předpokladu současné interakce Glu424(P450 2B4)-Lys24(cyt b₅) a Glu439(P450 2B4)-Lys19(cyt b₅) (C) a detailní pohled (D), kde je znázorněna interakce hemové skupiny cyt b₅ přes Asp78 (světle modře) s Arg 133 P450 2B4 (oranžově).

4.4 Studium molární stechiometrie membránového komplexu cytochromu P450 2B4 a cytochromu b₅

Technika síťování pomocí foto-aktivovatelného analogu methioninu nám umožnila zachytit protein-proteinové interakce v membránovém komplexu cytochromu P450 2B4 a cytochromu b₅. S využitím dalších přístupů byly analyzovány různé oligomerní stavy studovaného komplexu. Získané výsledky byly představeny v publikaci (viz Příloha č. 3):

Ječmen, T., Ptáčková, R., Kavan, D., Černá, V., Hodek, P., Stiborová, M., Hudeček, J., Šulc, M.: Quantification of interactions between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b₅ in a functional membrane complex, *Neuroendocrinology Letters*, přijato do tisku

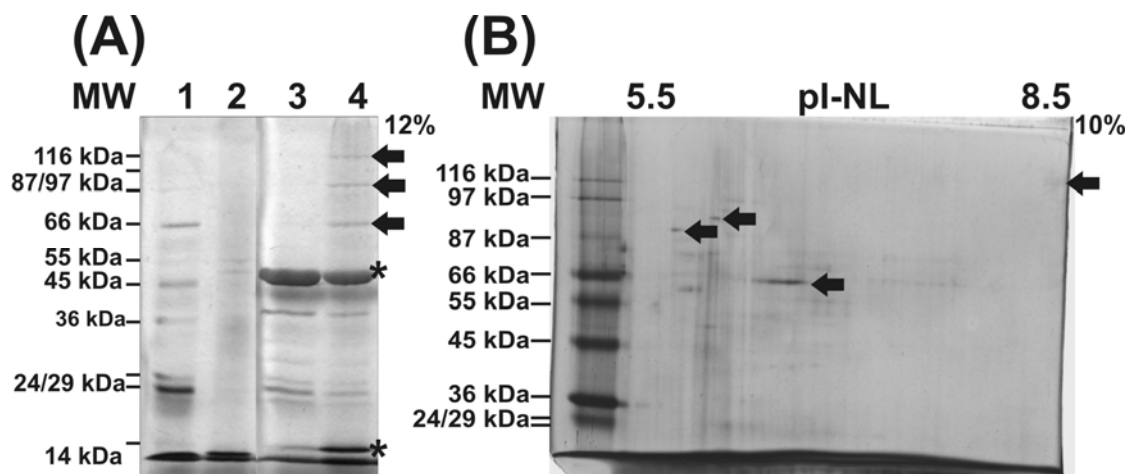
Cytochrom P450 2B4 a NAPH:P450 reduktasa (pro účely stanovení metabolické aktivity P450 2B4) byly purifikovány z mikrosomů získaných z homogenátu králíčích jater dle zavedeného protokolu [Šulc 2004, Šulc 2010]. Cytochrom b5 s inkorporovaným foto-Met na místo přirozeného Met (Met96 v části spojující membránovou a katalytickou doménu, Met126 a Met131 v membránové kotvě), tzv. proteinová foto-nanosonda, byl připraven s využitím techniky založené na *in vivo* aminokyselinově-specifické inkorporaci nepřirozených aminokyselin do struktury proteinu (metodický postup viz schéma na Obr. 10 na str. 36 a kapitola 4.1). Rekombinantní králíčí cytochrom b5 byl purifikován z bakteriálního lyzátu po jedné hodině produkce indukované pomocí IPTG dle dříve publikovaného protokolu [Kotrbová 2009]. Čistota a identita výsledných proteinových preparátů byla ověřena pomocí MS stejně jako míra inkorporace foto-Met do sekvence cyt b5.

Rekonstituce membránového komplexu P450 2B4 a cyt b5 byla provedena *in vitro* pomocí DLPC ve fosfátovém pufru o pH 7,4 a aktivita tohoto systému byla prokázána s využitím dříve zmíněného postupu (viz kapitola 4.3) [Šulc 2010]. Na základě testování různých molárních poměrů enzymů (1:1, 1:2, 1:4) bylo ve shodě s publikovanými daty [Im 2011] ukázáno, že v důsledku zvýšení koncentrace cyt b5 dochází ke stimulaci aktivity P450 2B4 (182%, 265%, 204% oproti kontrolnímu systému bez cyt b5). Porovnáme-li naměřené hodnoty s výsledky, kdy byl použit pyridinový pufr o pH 6,5 v případě síťování pomocí EDC (viz kapitola 4.3) je zřejmé, že hlavní předností prezentované techniky jsou reakční podmínky blízké fyziologickým. K dalším výhodám patří krátká doba inkubace (řádově minuty oproti hodinám) a nespecifita síťovacího činidla (vazba není limitována přítomností určité funkční skupiny).

Síťovací reakce byla iniciována UV světlem. Po ozáření směsi docházelo k aktivaci diazirinové funkční skupiny foto-Met zbytků přítomných v sekvenci cyt b5 a k tvorbě cross-linků (viz schéma na Obr. 7 na str. 27). Produkty síťovací reakce byly sledovány pomocí SDS-PAGE. Z Obr. 17 A na str. 58 je patrné, že kromě monomerů P450 2B4 (56 kDa) a cyt b5 (15 kDa) byly detekovány tři oligomerní komplexy lišící se zastoupením studovaných proteinů. Přítomnost obou cytochromů v jednotlivých prouzcích gelu byla ověřena pomocí MS analýzy.

Na základě přibližně stanovených molekulových hmotností identifikovaných proužků na elektroforeogramu SDS-PAGE lze odhadnout zastoupení molekul cytochromu P450 2B4 a b5 v daném komplexu. Molekulová hmotnost 68 ± 5 kDa odpovídá poměru

P450 2B4:cyt b5 1:1 (71 kDa) a hodnota 88 ± 5 kDa poměru 1:2 (86 kDa). V případě třetího komplexu o molekulové hmotnosti 125 ± 5 kDa nelze jednoznačně určit molární poměr cytochromů. V úvahu připadají varianty 2:1 (127 kDa), 1:4 (117 kDa), 1:5 (132 kDa) nebo i 1:3 (102 kDa) díky možným změnám v pohyblivosti cross-linkovaných proteinů na SDS-PAGE.



Obr. 17: Vizualizace produktů síťování pomocí foto-Met v *in vitro* rekonstituovaném membránovém komplexu cytochromu P450 2B4 a cytochromu b5. Identifikace kovalentně spojených proteinů pomocí SDS-PAGE (A) a 2D SDS-PAGE (B). Oba gely byly barveny stříbrem. V první dráze je standard molekulových hmotností. Na gelu vlevo je v dráze č. 2 cyt b5, v dráze č. 3 P450 2B4 a ve čtvrté dráze směs cytochromů po ozáření UV světlem. Monomery P450 2B4 (56 kDa) a cyt b5 (15 kDa) jsou označeny hvězdičkou a heterooligomerní komplexy proteinů (68 ± 5 kDa, 88 ± 5 kDa a 125 ± 5 kDa) šipkou. Na gelu vpravo byly proteiny po fotolýze děleny v horizontálním směru podle pI v oblasti hodnot 3-10NL (na gelu je použitý výřez IPG proužku 5,5 – 8,5) a dle molekulové hmotnosti ve vertikálním směru. P450 2B4 a cyt b5 nebyly v tomto případě detekovány neboť hodnota pI monomerů je mimo zvolený rozsah.

Kromě molekulové hmotnosti je každý komplex charakterizován svou specifickou hodnotou izoelektrického bodu (pI). Za účelem objasnění stechiometrie identifikovaných komplexů byla tedy provedena dvourozměrná SDS-PAGE (viz Obr. 17 B). Porovnáním teoretických a naměřených hodnot pI s ohledem na molekulovou hmotnost byla potvrzena tvorba heterodimeru a komplexu P450 2B4:cyt b5 v poměru 1:2 na základě dvou signálů, které pravděpodobně indikují dva rozdílné konformační stavy. U obou případů byla potvrzena přítomnost P450 2B4 i cyt b5 pomocí MS. Intenzita signálu u komplexu o molekulové hmotnosti 125 ± 5 kDa byla tak nízká, že ani v tomto případě nebylo možné s jistotou určit molární zastoupení proteinů a to i přes fakt, že pomocí 2D elektroforézy

bylo analyzováno čtyřnásobné množství produktu síťovací reakce ve srovnání s klasickou SDS-PAGE. Vzorek byl před nanesením na gel zakoncentrován srážením pomocí acetonitrilu a je možné, že právě v tomto kroku došlo ke ztrátě části preparátu.

Další zvolenou technikou byla analýza aminokyselinových zbytků pomocí Edmanova odbourávání od N-konce proteinu. Tato metoda však nevedla k pozitivnímu výsledku v důsledku nízké citlivosti. Za účelem zvýšení detekčního limitu byla provedena analýza aminokyselin po celkové hydrolýze proteinů v proužku gelu s následnou modifikací aminokyselin a separací pomocí HPLC. Díky vysoké koncentraci amoniaku, který byl uvolněn z polyakrylamidového gelu během hydrolýzy, nebylo ale možné na základě získaného chromatogramu detekovat signály pro jednotlivé aminokyseliny. Proto v dalším experimentu byly proteiny z gelu před hydrolýzou přeneseny na PVDF membránu díky čemuž došlo ke snížení množství amoniaku. Chromatogram získaný po HPLC separaci byl vyhodnocován s využitím hodnot celkových ploch pod křivkou pro jednotlivé zbytky aminokyselin. Tyto hodnoty byly normalizovány s využitím počtu zbytků určité aminokyseliny přítomných v navrženém komplexu a standardizovány dle určených normalizovaných dat pro jednotlivé aminokyseliny získaných analýzou studovaných monomerních proteinů o známé sekvenci. S využitím tohoto experimentálního postupu byl stanoven poměr P450 2B4:cyt b5 2:1 v oligomeru o molekulové hmotnosti 125 ± 5 kDa.

S využitím síťování pomocí foto-aktivovatelného analogu methioninu tak bylo ve shodě s předchozími výsledky (viz kapitola 4.3) prokázáno oligomerní uspořádání membránového komplexu P450 2B4 a cyt b5 a pomocí této nové techniky v kombinaci s dalšími přístupy mohl být navíc studován molární poměr cytochromů v rámci identifikovaných komplexů.

5 ZÁVĚRY

- 1) S využitím síťovací techniky pomocí foto-Met v kombinaci s MS analýzou byly identifikovány nové kontakty aminokyselin v interakční doméně homodimeru 14-3-3zeta (Met78-Gln8 a potenciální interakce Met1-Gln77) a byla tak potvrzena využitelnost nově zavedeného postupu k mapování transientních interakcí v komplexech proteinů.
- 2) Byla optimalizována inkorporace foto-Met do sekvence 14-3-3zeta s využitím kmene *E. coli* K-12 s deletovanou dráhou pro syntézu methioninu.
- 3) Heterodimerní komplex cytochromu P450 2B4 a cytochromu b5 byl zesíťován chemickým činidlem EDC a na základě identifikace vzniklých cross-linků pomocí MS byly ukázány dvě možné orientace katalytických domén cytochromů.
- 4) Technika síťování pomocí foto-aktivovatelného analogu methioninu umožnila zachytit různé oligomerní stavy membránového komplexu cytochromu P450 2B4 a cytochromu b5 a s využitím dalších přístupů – SDS-PAGE, kombinace isoelektrické fokusace a SDS-PAGE (2D SDS-PAGE), Edmanovo odbourávání od N-konce proteinu a analýza aminokyselinových zbytků byl stanoven molární poměr cytochromů v identifikovaných komplexech proteinů (P450 2B4:cyt b5 ~ 1:1, 1:2 a 2:1).

SEZNAM PUBLIKACÍ

Ječmen, T., Ptáčková, R., Kavan, D., Černá, V., Hodek, P., Stiborová, M., Hudeček, J., Šulc, M.: Quantification of interactions between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5 in a functional membrane complex, *Neuroendocrinology Letters*, přijato do tisku

Ptáčková, R., Ječmen, T., Novák, P., Hudeček, J., Stiborová, M., Šulc, M.: The application of an emerging technique for protein-protein interaction interface mapping: the combination of photo-initiated cross-linking protein nanoprobe with mass spectrometry, *International Journal of Molecular Sciences* 15, 9224-41 (2014)

Šulc, M., Ječmen, T., Šnajdrová, R., Novák, P., Martínek, V., Hodek, P., Stiborová, M., Hudeček, J.: Mapping of interaction between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5: the first evidence of two mutual orientations, *Neuroendocrinology Letters* 33 Suppl. 3, 41-7 (2012)

POUŽITÁ LITERATURA

- Aebersold, R.; Mann, M.: *Nature* 422, 198-207 (2003).
- Alberts, B.: *Cell* 92, 291-294 (1998).
- Amster, I. J.: *J. Mass Spectrom.* 31, 1325 – 1337 (1996).
- Anderson, J. C.; Wu, N.; Santoro, S. W.; Lakshman, V.; King, D. S.; Schultz, P. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7566-7571 (2004).
- Bacher, J. M.; Ellington, A. D.: *J. Bacteriol.* 183, 5414-5425 (2001).
- Barabasi, A. L.; Oltvai, Z. N.: *Nat. Rev. Genet.* 5, 101-113 (2004).
- Beier, H.; Grimm, M.: *Nucleic Acids Res.* 29, 4767-4782 (2001).
- Boehr, D. D.; Nussinov, R.; Wright, P. E.: *Nat. Chem. Biol.* 5, 789–796 (2009).
- Bohrer, B. C.; Merenbloom, S. I.; Koeniger, S. L.; Hilderbrand, A. E.; Clemmer, D. E.: *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1, 293–327 (2008).
- Bonfils, C.; Balny, C.; Maurel, P.: *J Biol Chem.* 256, 9457–9465 (1981).
- Bridges, A.; Gruenke, L.; Chang, Y.-T.; Vakser, I. A.; Loew, G.; Waskell, L.: *J. Biol. Chem.* 273, 17036-17049 (1998).
- Bridges, D.; Moorhead, G. B.: *Sci. STKE* 242, re10, (2004).
- Bruce, J. E.: *Proteomics* 12, 1565–1575 (2012).
- Clarke, T. A.; Im, S.-C.; Bidwai, A.; Waskell, L.: *J. Biol. Chem.* 279, 36809–36818 (2004).
- Comisarow, M. B.; Marshall, A. G.: *Chem. Phys. Lett.* 25, 282–283 (1974).
- Comisarow, M. B.; Marshall, A. G.: *Chem. Phys. Lett.* 26, 489–490 (1974).
- Coon, J.: *J. Anal. Chem.* 81, 3208–3215 (2009).
- Coon, M. J.: *Nutr. Rev.* 36, 319-328 (1978).
- Cowie, D. B.; Cohen, G. N.: *Biochim. Biophys. Acta.* 26, 252-261 (1957).
- Crick, F. H.: *J. Mol. Biol.* 19, 548-555 (1996).
- Dass, Ch.: Basics of mass spectrometry, v knize Fundamentals of contemporary mass spectrometry, vydalo nakl. John Wiley & Sons, Inc., str. 3-14 (2007a).
- Dass, Ch.: Modes of Ionization, v knize Fundamentals of contemporary mass spectrometry, vydalo nakl. John Wiley & Sons, Inc., str. 15-66 (2007b).
- Dass, Ch.: Mass Analysis and Ion Detection, v knize Fundamentals of contemporary mass spectrometry, vydalo nakl. John Wiley & Sons, Inc., str. 67-118 (2007c).
- Dass, Ch.: Tandem mass spectrometry, v knize Fundamentals of contemporary mass spectrometry, vydalo nakl. John Wiley & Sons, Inc., str. 119-150 (2007d).
- Datta, D.; Vaidehi, N.; Zhang, D.; Goddard, W. A.: *Protein Sci.* 10, 2693-2705 (2004).
- Douglas, R. H.; Hultquist, D. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3118–3122 (1978).
- Dreisewerd, K.: *Chem. Rev.* 103, 395–425 (2003).
- Durley, R. C. E.; Mathews, F. S.: *Acta Crystallogr.* D52, 65–76 (1996).

- Dürr, U. H. N.; Waskell, L.; Ramamoorthy, A.: *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 3235–3259 (2007).
- Egli, M.: *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **41** (7, 7.13), 1–7 (2010).
- Englander, S. W.; Sosnick, T. R.; Englander, J. J.; Mayne, L.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 18–23 (1996).
- Englander, S. W.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 1481–1489 (2006).
- Enoch, H. G.; Strittmatter, P.: *J. Biol. Chem.* **254**, 8976–8981 (1979).
- Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M.: *Science* **246** (4926), 64–71 (1989).
- Ganguly, S.; Weller, J. L.; Ho, A.; Chemineau, P.; Malpaux, B.; Klein, D. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 1222–1227 (2005).
- Gardino, A. K.; Smerdon, S. J.; Yaffe, M. B.: *Semin. Cancer Biol.* **16**, 173–182 (2006).
- Gauthier, J. W.; Trautmann, T. R.; Jacobson, D. B.: *Anal. Chim. Acta* **246** (21), 1–225 (1991).
- Gibson, D. G.; Glass, J. I.; Lartigue, C.; Noskov, V. N.; Chuang, R. -Y.; Algire, M. A.; Benders, G. A.; Montague, M. G.; Ma, L.; Moodie, M. M.; Merryman, C.; Vashee, S.; Krishnakumar, R.; Assad-Garcia, N.; Andrews-Pfannkoch, C.; Denisova, E.; Young, L.; Qi, Z. -Q.; Segall-Shapiro, T. H.; Calvey, C. H.; Parmar, P. P.; Hutchison III, C. A.; Smith, H. O.; Venter, J. C.: *Science* **329**, 52–56 (2010).
- Glish, G. L.; Vachet, R. W.: *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 140–150 (2003).
- Goltermann, L.; Larsen, M. S.; Banerjee, R.; Joerger, A. C.; Ibba, M.; Bentin, T.: *PLoS One.* **5**, e10104 (2010).
- Goodwin, M. S.; Weiss, A. A.: *Infect. Immun.* **58**, 3445–3447 (1990).
- Götze, M.; Pettelkau, J.; Schaks, S.; Bosse, K.; Ihling, C. H.; Krauth, F.; Fritzsche, R.; Kühn, U.; Sinz, A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**(1), 76–87 (2012).
- Guengerich, F. P.: Human cytochrome P450 enzymes, v knize *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, vydalo nakl. Ortiz de Montellano PR, Cyto, New York, Kluwer Press., str. 377–531 (2005).
- Haladová, K.: Hmotnostní spektrometrie v proteomice: strukturní biologie a klinické aplikace, Disertační práce, PřF UK v Praze, Katedra biochemie (2011).
- Haladová, K.; Mrázek, H.; Ječmen, T.; Halada, P.; Man, P.; Novak, P.; Chmelík, J.; Obšil, T.; Šulc, M.: *J. Struc. Biol.* **179**, 10–17 (2012).
- Hatfield, D. L.; Carlson, B. A.; Xu, X. M.; Mix, H.; Gladyshev, V. N.: *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **81**, 97–142 (2006).
- Heeren, R. M. A.; Keinnijenhuis, A. J. ; McDonnell, L. A. ; Mize, T. H.: *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 1048–1058 (2004).
- Hendrickson, T. L.; de Crecy-Lagard, V.; Schimmel, P.: *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 147–176 (2004).
- Hendrickson, W.; Horton, J. R.; LeMaster, D. M.: *EMBO J.* **9**, 1665–1672 (1990).
- Henzler-Wildman, K.; Kern, D.: *Nature* **450**, 964–972 (2007).
- Hlavica, P.: *Arch. Biochem. Biophys.* **228**, 600–608 (1984).
- Hlavica, P.; Lewis, D. F. V.: *Eur. J. Biochem.* **268**, 4817–4832 (2001).
- Hohsaka, T.; Sato, K.; Sisido, M.; Takai, K.; Yokoyama, S.: *FEBS Lett.* **344**, 171–174 (1994).
- Holčapek, M.; Jirásko, R.; Lísá, M.: *J. Chromatogr. A.* **1259**, 3–15 (2012).
- Holowka, D.; Gould, H. J.; Baird, B.; McLafferty, F. W.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 806–812 (1999).
- Hossain, B. M.; Simmons, D. A.; Konermann, L.: *Can. J. Chem.* **83**, 1953–1960 (2005).

- Hyung, S.-J.; Robinson, C.V.; Ruotolo, B. T.: *Chem. Biol.* **16**, 382–390 (2009).
- Chaurand, P.: *J. Proteomics* **75**, 4883–4892 (2012).
- Chavez, J. D.; Weisbrod, C. R.; Zheng, C. X.; Eng, J. K.; Bruce, J. E.: *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 1451–1467 (2013).
- Chen, J. F.; Guo, N. N.; Li, T.; Wang, E. D.; Wang, Y. L.: *Biochemistry* **39**, 6726–6731 (2000).
- Chen, S.; Schultz, P. G.; Brock, A.: *J. Mol. Biol.* **371**, 112–122 (2007).
- Cho, H.; Daniel, T.; Buechler, Y. J.; Litzinger, D. C.; Maio, Z.; Putnam, A. H.; Kraynov, V. S.; Sim, B.; Bussell, S.; Javahishvili, T.; Kaphle, S.; Viramontes, G.; Ong, M.; Chu, S.; GC, B.; Lieu, R.; Knudsen, N.; Castiglioni, P.; Norman, T. C.; Axelrod, D. W.; Hoffman, A. R.; Schultz, P. G.; DiMarchi, R. D.; Kimmel, B. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 9060–9065 (2011).
- Ibba, M.; Becker, H. D.; Stathopoulos, C.; Tumbula, D. L.; Soll, D.: *Trends Biochem. Sci.* **25**, 311–316 (2000a).
- Ibba, M.; Söll, D.: *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 617–650 (2000b).
- Im, S. C.; Waskell, L.: *Arch. Biochem. Biophys.* **507**, 144–153 (2011).
- Inutan, E. D.; Wager-Miller, J.; Mackie, K.; Trimpin, S.: *Anal. Chem.* **84**, 9079–9084 (2012).
- Johnson, C.; Crowther, S.; Stafford, M. J.; Campbell, D. G.; Toth, R.; Mackintosh, C.: *Biochem. J.* **427**, 69–78 (2010).
- Johnson, E. F.; Stout, C. D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 331–336 (2005).
- Kalkhof, S.; Ihling, C.; Mechtler, K.; Sinz, A.: *Anal. Chem.* **77**, 495–503 (2005).
- Kaltashov, I. A.; Eyles, S. J.: *J. Mass Spectrom.* **37**, 37 – 71 (2002).
- Kaltashov, I. A.; Mohimen, A.: *Anal. Chem.* **77**, 5370–5379 (2005).
- Kaltashov, I. A.; Bobst, C. E.; Abzalimov, R. R.: *Protein Sci.* **22**, 530–544 (2013).
- Karas, M.; Hillenkamp, F.: *Anal. Chem.* **60** (20), 2299–301 (1988).
- Karas, M.; Krüger, R.: *Chem. Rev.* **103**, 427 – 439 (2003).
- Katritch, V.; Cherezov, V.; Stevens, R. C.: *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 17–27 (2012).
- Kelleher, N.L.; Lin, H. Y.; Valsakovic, G. A.; Aaserud, D. J.; Fridrikson, E. K.; Beavil, A.; Kiselar, J.G.; Chance, M.R.: *J. Mass Spectrom.* **45**, 1373–1382 (2010).
- Khelef, N.; Sakamoto, H.; Guiso, N.: *Microb. Pathog.* **12**, 227–235 (1992).
- Klockenbusch, C.; O’Hara, J. E.; Kast, J.: *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 1057–1067 (2012).
- Knochenmuss, R.; Zenobi, R.: *Chem. Rev.* **103**, 441 –452 (2003).
- Konermann, L.; Stocks, B. B.; Pan, Y.; Tong, X.: *Mass Spectrom. Rev.* **29**, 651–667 (2010).
- Konermann, L.; Vahidi, S.; Sowole, M. A.: *Anal. Chem.* **86**, 213–232 (2014).
- Konijnenberg, A.; Butterer, A.; Sobott, F.: *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 1239–1256 (2013).
- Kotrbová, V.; Aimová, D.; Ingr, M.; Bořek-Dohalská, L.; Martínek, V.; Stiborová, M.: *Protein Expr. Purif.* **66**, 203–209 (2009).
- Kotrbová, V.; Mrázová, B.; Moserová, M.; Martínek, V.; Hodek, P.; Hudeček, J.; Frei, E.; Stiborová, M.: *Biochem. Pharmacol.* **82**, 669–80 (2011).
- Krzycki, J. A.: *Curr. Opin. Microbio.* **8**, 706–712 (2005).

- Kwon, I.; Kirshenbaum, K.; Tirrell, D. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7512-7513 (2003).
- Lee, Y. J.: *Mol. Biosyst.* **4**, 816–823 (2008).
- Leitner, A.; Walzthoeni, T.; Kahraman, A.; Herzog, F.; Rinner, O.; Beck, M.; Aebersold, R.: *Mol. Cell. Proteomics* **9** 1634–1649 (2010).
- Ling, J.; Reynolds, N.; Ibba, M.: *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 61–78 (2009).
- Link, A. J.; Vink, M. K. S.; Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R.; Tirrell, D. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 10180–10185 (2006).
- Little, D. P.; Speir, J. P.; Senko, M. W.; O'Connor, P. B.; McLafferty, F. W.: *Anal. Chem.* **66**, 2809–2815 (1994).
- Liu, D.; Bienkowska, J.; Petosa, C.; Collier, R. J.; Fu, H.; Liddington, R.: *Nature* **376**, 191–194 (1995).
- Lomize, M.A.; Lomize, A. L.; Pogozheva, I. D.; Mosberg, H. I.: *Bioinformatics* **22**, 623-625 (2006).
- Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.; Jackson, G. S.: *Mass Spectrom. Rev.* **17**, 1–35 (1998).
- Marshall, A. G.: *Int. J. Mass Spectrom.* **200**, 331–356 (2000).
- Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.: *Int. J. Mass Spectrom.* **215**, 59–75 (2002).
- McLafferty, F. W.; Fridriksson, E. K.; Horn, D. M.; Lewis, M. A.; Zubarev, R. A.: *Science* **284**, 1289–1290 (1999).
- McLuckey, S. A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **3**, 599–614 (1992).
- Milne, J. L. S.; Borgnia, M. J.; Bartesaghi, A.; Tran, E. E. H.; Earl, L. A.; Schauder, D. M.; Lengyel, J.; Pierson, J.; Patwardhan, A.; Subramaniam, S.: *FEBS J.* **280**, 28–45 (2013).
- Mittermaier, A.; Kay, L. E.: *Science* **312**, 224–228 (2006).
- Mursinna, R. S.; Lincecum, T. L.; Martinis, S. A.: *Biochemistry* **40**, 5376-5381 (2001).
- Muskett, F. W.; Kelly, G. P.; Whitford, D.: *J. Mol. Biol.* **258**, 172–189 (1996).
- Muslin, A. J.; Tanner, J. W.; Allen, P. M.; Shaw, A. S.: *Cell* **84**, 889-897 (1996).
- Nelson, D. R.; Zeldin, D.C.; Hoffman, S. M. G.; Maltais, L. J.; Wain, H. M.; Nebert, D. W.: *Pharmacogenetics* **14**, 1–14 (2004).
- Neumann, H.; Slusarczyk, A. L.; Chin, J. W.: *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 2142-2144 (2010a).
- Neumann, H.; Wang, K.; Davis, L.; Garcia-Alai, M.; Chin, J. W.: *Nature* **464**, 441-444 (2010b).
- Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G.: *Science* **244**, 182-188 (1989).
- Novák, P.; Haskins, W. E.; Ayson, M. J.; Jacobsen, R. B.; Schoeniger, J. S.; Leavell, M. D.; Young, M. M.; Kruppa, G. H.: *Anal. Chem.* **77**, 5101–5108 (2005).
- Obšil, T.; Ghirlando, R.; Klein, D. C.; Ganguly, S.; Dyda, F.: *Cell* **105** (2), 257-67 (2001).
- Obšil, T.; Obšilová, V.: *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 663-672 (2011).
- Obšilová, V.; Herman, P.; Večeř, J.; Šulc, M.; Teisinger, J.; Obšil, T.: *J. Biol. Chem.* **279**, 4531-4540 (2004).
- Obšilová, V.; Nedbálková, E.; Šilhán, J.; Bouřa, E.; Herman, P.; Večeř, J.; Šulc, M.; Teisinger, J.; Dyda, F.; Obšil, T.: *Biochemistry* **47** (6), 1768-77 (2008).
- Ottmann, C.; Marco, S.; Jaspert, N.; Marcon, C.; Schauer, N.; Weyand, M.; Vandermeeren, C.; Duby, G.; Boutry, M.; Wittinghofer, A.; Rigaud, J. L.; Oecking, C.: *Mol. Cell* **25** (3), 427-40 (2007).
- Paizs, B.; Suhai, S.: *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 508–548 (2005).
- Parker, J.: *Microbiol. Rev.* **53**, 273-289 (1989).

- Parker, M. W.: *J. Biol. Phys.*, 29, 341–362 (2003).
- Pertl-Obermeyer, H.; Schulze, W. X.; Obermeyer, G.: *J. Proteomics* 108, 17-29 (2014).
- Pozuelo, R. M.; Geraghty, K. M.; Wong, B. H.; Wood, N. T.; Campbell, D. G.; Morrice, N.; Mackintosh, C.: *Biochem. J.* 379, 395–408 (2004).
- Rackham, O.; Chin, J. W.: *Nat. Chem. Biol.* 1, 159-166 (2005).
- Rappsilber, J.: *J. Struct. Biol.* 173, 530–540 (2011).
- Rittinger, K.; Budman, J.; Xu, J.; Volinia, S.; Cantley, L. C.; Smerdon, S. J.; Gamblin, S. J.; Yaffe, M. B.: *Mol. Cell* 4, 153-166 (1999).
- Robinson, C. V.; Sali, A.; Baumeister, W.: *Nature* 450, 973–982 (2007).
- Robinson, C. V.: *FEBS J.* 279, 663–677 (2012).
- Rozbeský, D.; Man, P.; Kavan, D.; Chmelík, J.; Černý, J.; Bezouška, K.; Novák, P.: *Anal. Chem.* 84, 867-870 (2012).
- Řežábková, L.; Bouřa, E.; Herman, P.; Večeř, J.; Bouřová, L.; Šulc, M.; Svoboda, P.; Obšilová, V.; Obšil, T.: *J. Struct. Biol.* 170 (3), 451-61 (2010).
- Seliskar, M.; Rozman, D.: *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 458–466 (2007).
- Shimada, T.; Fournier, E. A.; Yamagata, K.: *Biomed. Res. Inter.* 2013, 11 (2013).
- Schenkman, J. B.; Jansson, I.: *Pharmacol. Ther.* 97, 139-152 (2003).
- Schilling, B.; Row, R. H.; Gibson, B. W.; Guo, X.; Young, M. M.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 834–850 (2003).
- Schumacher, B.; Mondry, J.; Thiel, P.; Weyand, M.; Ottmann, C.: *FEBS Lett.* 584 (8), 1443-8 (2010).
- Sinz, A.: *J. Mass Spectrom.* 38, 1225–1237 (2003).
- Sinz, A.: *Mass Spectrom. Rev.* 25, 663–682 (2006).
- Sinz, A.: *Chem. Med. Chem.* 2, 425–431 (2007).
- Skinner, O. S.; McLafferty, F. W.; Breuker, K.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23, 1011–1014 (2012).
- Sleno, L.; Volmer, D. A.: *J. Mass Spectrom.* 39, 1091–1112 (2004).
- Sobott, F.; McCammon, M. G.; Robinson, C. V.: *Int. J. Mass Spectrom.* 230, 193–200 (2003).
- Söll, D.; RajBhandary, U. L.: kniha *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*, vydalo nakl. Washington D. C, ASM Press. (1995).
- Srinivasan, G.; James, C. M.; Krzycki, J. A.: *Science*. 296, 1459-1462 (2002).
- Stengel, F.; Aebersold, R.; Robinson, C. V.: *Mol. Cell. Proteomics* 11 (3), R111.014027 (2012).
- Stephens, W. E.: *Phys. Rev.* 69, 691 (1946).
- Stiborová, M.; Černá, V.; Moserová, M.; Arlt, V. M.; Frei, E.: *Neuro. Endocrinol. Lett.* 34 (2), 43-54 (2013).
- Suchanek, M.; Radzikowska, A.; Thiele, C.: *Nature Meth.* 2, 261–267 (2005).
- Šilhán, J.; Obšilová, V.; Večeř, J.; Herman, P.; Šulc, M.; Teisinger, J.; Obšil, T.: *J. Biol. Chem.* 279, 49113-49119 (2004).
- Šilhán, J.; Vácha, P.; Strnadová, P.; Večeř, J.; Herman, P.; Šulc, M.; Teisinger, J.; Obšilová, V.; Obšil, T.: *J. Biol. Chem.* 284 (29), 19349-60 (2009).
- Šulc, M.; Hudeček, J.; Stiborová, M.; Hodek, P.: *Neuro. Endocrinol. Lett.* 29, 722–727 (2008).

- Takamoto, K.; Chance, M. R.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 251–276 (2006).
- Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 151–153 (1988).
- Tang, Y.; Tirrell, D. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11089–11090 (2001).
- Tang, Y.; Tirrell, D. A.: *Biochemistry* **4**, 10635–10645 (2002).
- Tang, Y.; Wang, P.; van Deventer, J. A.; Link, A. J.; Tirrell, D. A.: *ChemBioChem* **10**, 2188–2190 (2009).
- Tanrikulu, I. C.; Schmitt, E.; Mechulam, Y.; Goddard, W. A.; Tirrell, D. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 15285–15290 (2009).
- Trester-Zedlitz, M.; Kamada, K.; Burley, S. K.; Fenyo, D.; Chait, B. T.; Muir, T. W.: *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 2416–2425 (2003).
- Truong, A. B.; Masters, S. C.; Yang, H.; Fu, H.: *Proteins* **49**, 321–325 (2002).
- Vergères, G.; Ramsden, J.; Waskell, L.: *J. Biol. Chem.* **270**, 3414–3422 (1995).
- Voloshchuk, N.; Montclare, J. K.: *Mol. Biosyst.* **6**, 65–80 (2010).
- Wang, A.; Nairn, N. W.; Marelli, M.; Grabstein, K.: *Protein Engineering with Non-Natural Amino Acids*, v knize *Protein Engineering*, vydalo nakl. Prof. Pravin Kaumaya, InTech, str. 253–290 (2012).
- Wang, K.; Neumann, H.; Peak-Chew, S. Y.; Chin, J. W.: *Nat. Biotechnol.* **25**, 770–777 (2007).
- Wang, L.; Schultz, P. G.: *Chem. Biol.* **8**, 883–890 (2001).
- Wang, L.; Chance, M.R.: *Anal. Chem.* **83**, 7234–7241 (2011).
- Wang, P.; Fichera, A.; Kumar, K.; Tirrell, D. A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 3664–3666 (2004).
- Wang, Q.; Wang, L.: *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6066–6067 (2008).
- Whitelegge, J. P.: *Anal. Chem.* **85**, 2558–2568 (2013).
- Whitford, D.: *An Introduction to protein structure and function v knize Proteins – structure and function*, vydalo nakl. John Wiley & Sons, Inc., str. 1–9 (2005a).
- Whitford, D.: *The three-dimensional structure of proteins v knize Proteins - structure and function*, vydalo nakl. John Wiley & Sons, Inc., str. 39–83 (2005b).
- Williams, A.; Ibrahim, I. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 7090–7095 (1981).
- Wilm, M.; Mann, M.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **136**, 167–180 (1994).
- Wilm, M.; Mann, M.: *Anal. Chem.* **68**, 1–8 (1996).
- Woese, C. R.; Olsen, G. J.; Ibba, M.; Söll, D.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 202–236 (2000).
- Wytenbach, T.; Bowers, M. T. J.: *Phys. Chem. B* **115**, 12266–12275 (2011).
- Xiao, B.; Smerdon, S. J.; Jones, D. H.; Dodson, G. G.; Soneji, Y.; Aitken, A.; Gamblin, S. J.: *Nature* **376**, 188–191 (1995).
- Yaffe, M. B.; Rittinkger, K.; Volinia, S.; Caron, P. R.; Aitken, A.; Leffers, H.; Gamblin, S. J.; Smerdon, S. J.; Cantley, L. C.: *Cell* **91**, 961–971 (1997).
- Yamamoto, K.; Durr, U. H. N.; Xu, J.; Im, S.-Ch.; Percy, P.; Waskell, L.; Ramamoorthy, A.: *Sci. Rep.* **3**, 1–5 (2013).
- Yang, X.; Lee, W. H.; Sobott, F.; Papagrigoriou, E.; Robinson, C. V.; Grossmann, J. G.; Sundström, M.; Doyle, D. A.; Elkins, J. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 17237–42 (2006).
- Yoo, T. H.; Tirrell, D.A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 5340–5343 (2007).

- Young, M. M.; Tang, N.; Hempel, J. C.; Oshiro, C. M.; Taylor, E. W.; Kuntz, I. D.; Gibson, B. W.; Dollinger, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5802–5806 (2000).
- Zhang, A.; Im, S. C.; Waskell, L.: *J. Biol. Chem.* 282, 29766–76 (2007).
- Zhang, H.; Gruenke, L.; Arscott, D.; Shen, A.; Kasper, C.; Harris, D. L.; Glavanovich, M.; Johnson, R.; Waskell, L.: *Biochemistry* 42, 11594–11603 (2003).
- Zhang, H.; Myshkin, E.; Waskell, L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 499–506 (2005).
- Zhang, K.; Li, H.; Cho, K. M.; Liao, J. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 6234–6239 (2010).
- Zhang, Y.; Smith, D. L.: *Protein Sci.* 2, 522 – 531 (1993).
- Zheng, X.; Wintrode, P. L.; Chance, M. R.: *Structure* 16, 38–51 (2008).
- Zhurov, K. O.; Fornelli, L.; Wodrich, M. D.; Laskay, U. A.; Tsybin, Y. O. *Chem. Soc. Rev.* 42, 5014–5030 (2013).
- Zinoni, F.; Birkmann, A.; Leinfelder, W.; Bock, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3156–3160 (1987).
- Zubarev, R. A.; Kelleher, N. L.; McLafferty, F. W. : *J. Am. Chem. Soc.* 120, 3265 – 3266 (1998).
- Zubarev, R. A.: *Mass Spectrom Rev* 22, 57–77 (2003).
- Zubarev, R. A.; Zubarev, A. R.; Savitski, M. M.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, 753–761 (2008).

PŘÍLOHY

Příloha č. 1

Ptáčková, R., Ječmen, T., Novák, P., Hudeček, J., Stiborová, M., Šulc, M.

The application of an emerging technique for protein-protein interaction interface mapping: the combination of photo-initiated cross-linking protein nanoprobes with mass spectrometry

International Journal of Molecular Sciences 15, 9224-41 (2014)

Podíl disertantky na publikaci: rekombinantní exprese 14-3-3zeta WT a 14-3-3zeta S58D s inkorporovaným foto-Met, stanovení míry inkorporace foto-Met pomocí MALDI-TOF MS, purifikace proteinů, síťovací reakce, SDS-PAGE, participace na přípravě publikace

Article

The Application of an Emerging Technique for Protein–Protein Interaction Interface Mapping: The Combination of Photo-Initiated Cross-Linking Protein Nanoprobes with Mass Spectrometry

Ptáčková Renata ^{1,2}, Ječmen Tomáš ^{1,2}, Novák Petr ^{1,2}, Hudeček Jiří ²,
Stiborová Marie ² and Šulc Miroslav ^{1,2,*}

¹ Institute of Microbiology v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, CZ-14220 Prague 4, Czech Republic; E-Mails: renat.s@seznam.cz (P.R.); tomas.jecmen@centrum.cz (J.T.); pnovak@biomed.cas.cz (N.P.)

² Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030, CZ-12843 Prague 2, Czech Republic; E-Mails: jiri.hudecek@natur.cuni.cz (H.J.); stiborov@natur.cuni.cz (S.M.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: msulc@biomed.cas.cz; Tel.: +420-2-4106-2644; Fax: +420-2-4106-2156.

Received: 17 January 2014; in revised form: 6 May 2014 / Accepted: 9 May 2014 /

Published: 26 May 2014

Abstract: Protein–protein interaction was investigated using a protein nanoprobes capable of photo-initiated cross-linking in combination with high-resolution and tandem mass spectrometry. This emerging experimental approach introduces photo-analogs of amino acids within a protein sequence during its recombinant expression, preserves native protein structure and is suitable for mapping the contact between two proteins. The contact surface regions involved in the well-characterized interaction between two molecules of human 14-3-3 ζ regulatory protein were used as a model. The employed photo-initiated cross-linking techniques extend the number of residues shown to be within interaction distance in the contact surface of the 14-3-3 ζ dimer (Gln8–Met78). The results of this study are in agreement with our previously published data from molecular dynamic calculations based on high-resolution chemical cross-linking data and Hydrogen/Deuterium exchange mass spectrometry. The observed contact is also in accord with the 14-3-3 ζ X-ray crystal structure (PDB 3dhr). The results of the present work are relevant to the structural biology of transient interaction in the 14-3-3 ζ protein, and demonstrate the ability of the chosen

methodology (the combination of photo-initiated cross-linking protein nanoprobe and mass spectrometry analysis) to map the protein-protein interface or regions with a flexible structure.

Keywords: 14-3-3 ζ homodimer; protein-protein interaction; photo cross-linking; protein nanoprobe; mass spectrometry

1. Introduction

The use of photo-initiated cross-linking of protein nanoprobe in combination with mass spectrometry (MS) is an experimental technique suitable for the determination of the assembly of protein complexes in their native states at reasonable time-scales using relatively small quantities of protein [1]. This approach is an alternative to chemical cross-linking, but more powerful due to the absence of limitations in reaction specificity and restrictions on reaction conditions that are inherent to chemical cross-linkers [1].

For this experimental approach, the protein of interest was purified after recombinant expression that incorporated the amino acid residues with a photo-labile group [2]. The incubation and photo-activation of the studied protein produced a mixture of covalently cross-linked homodimers. The abundance of cross-linked species with diverse protein orientations statistically depends on the incidence of these transient interactions in the reaction mixture. The next steps were separation of monomers and homodimers (e.g., by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)), digestion of cross-linked species, and analysis of the resulting peptide mixture employing MS techniques. The high accuracy of MS data enables the identification of the unique combination of two cross-linked peptide sequences that conform to protease specificity (e.g., trypsin generates peptides with C-terminal arginine or lysine). The deduction of which two amino acid residues participate in the covalent coupling of two cross-linked peptides is based on the acquisition of the tandem mass spectra (MS/MS), which provides structural information about the analyzed species. When photo-amino acid analogs are introduced into the protein sequence, the highly reactive carbene formed after UV-light photolysis of photo-labile diazirine reacts non-specifically, it is able to connect any group, and forms cross-links of zero-length. Because the MS/MS analysis allows identification of amino acid cross-linked residues and the reaction radius of the carbene species is approximately within distances under 5 Å (similarly to the zero-length chemical cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethyl (aminopropyl)) carbodiimide hydrochloride (EDC) [3]), sufficient information to deduce distance constraints between identified residues and to map the interface in the studied protein complex could be obtained. Generally, the experimental approach described in this work offers the ability to study not only homodimer formation, but also to generate oligomers, depending on the subunit arrangements in a protein complex. Because of the method's ability to promote protein-protein interaction, it also allows for the possibility to characterize the formation of heteromers, the particular identities of which will be dependent on the composition of the studied protein-mixture and the protein-protein functionality.

The 14-3-3 proteins represent a broad class of highly conserved regulatory proteins found in all eukaryotic cells and involved in different cellular pathways. Their main overall function depends on self-assembling into dimers *in vivo* and *in vitro* [4]. This dimerization is mediated by electrostatic interactions between the N-terminal regions of two 14-3-3 subunits and can be regulated by site-specific

phosphorylation at serine 58 *in vivo* and *in vitro* [5]. The three salt bridges: Arg18–Glu89, Glu5–Lys74, and Asp21–Lys85, as well as several buried polar and hydrophobic residues (Leu12, Ala16, Ser58, Val62, Ile65, and Tyr82) have been described to be involved in the homodimer interface by analysis of a wide range of 14-3-3 homodimer crystal structures [6]. Hydrogen/Deuterium (H/D) exchange techniques revealed the interaction of the *N*-terminal sequence (the first 27 residues of α A-helix) from one subunit with residues 45-98 (α C'-helices and α D'-helices) of the other molecule across the dimer interface. Chemical cross-linking experiments using a zero-length carbodiimide EDC extended the number of amino acid residues detected to be interacting within the studied complex by identifying two alternative salt bridges between Glu81 and either Lys9 or the *N*-terminal amino-group. Molecular modeling was employed to verify the accuracy of the observed chemical cross-links and/or to illustrate their potential structural arrangement, using the published 14-3-3 crystal structure as a starting point for the docking calculations [7]. The resulting model illustrated the feasibility of the observed interaction and visualized its native structure in solution. Therefore, this well-defined homodimeric protein–protein interaction was used to validate the emerging technique of combining photo-initiated cross-linking protein nanoprobe with high-resolution MS and MS/MS technique. Moreover, further amino acid residues participating in transient interactions of this 14-3-3 ζ isotype homodimerization were identified.

2. Results

2.1. Preparation and Characterization of 14-3-3 ζ Proteins

To carry out the above described experiment, highly purified and well-characterized recombinant proteins, dimeric 14-3-3 ζ “wild type” (14-3-3 ζ WT) and monomeric 14-3-3 ζ mutant, prepared with partial incorporation of the photo-labile analog of methionine into the protein sequence, were obtained from *Escherichia coli* (*E. coli*) lysate. In the mutant, the introduction of a negative charge at position 58 mimics Ser58 phosphorylation (14-3-3 ζ S58D) [8]. They were brought to electrophoretic homogeneity by employing techniques preserving the native structure of these proteins. The incorporation of the photo-labile analog of methionine during recombinant expression in *E. coli* is possible due to adequate structural analogy and the lower specificity of methionine-tRNA synthetase. The matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis of trypsinized proteins using the mass fingerprinting approach confirmed not only the identities of both proteins (see Table 1 for individual values of protein concentrations and sequence coverage), but also verified the successful cleavage of the *N*-terminal histidine tag from protein sequence by thrombin for both protein constructs. The high number of matched peptides resulting from a manual interpretation of all the received *m/z* signals indicates the high purity of both analyzed proteins. Because only partial incorporation of the photo-labile methionine analog in place of naturally present methionine within the protein sequence was suggested, the MALDI-TOF analysis of the trypsinized protein nanoprobe was also used to verify sufficient photo-labile analog incorporation. This was confirmed by the detection of signals indicating both tryptic peptides containing methionine and signals corresponding to tryptic peptides with methionine analog (mass shift 19.972 m.u.). For example in preparations of 14-3-3 ζ WT, the presence of the peptide (159)EMGPETHPIR(167) of the protein sequence should be revealed in the mixture of tryptic peptides by a signal at *m/z* 1108.5568. No such signal was detected before protein

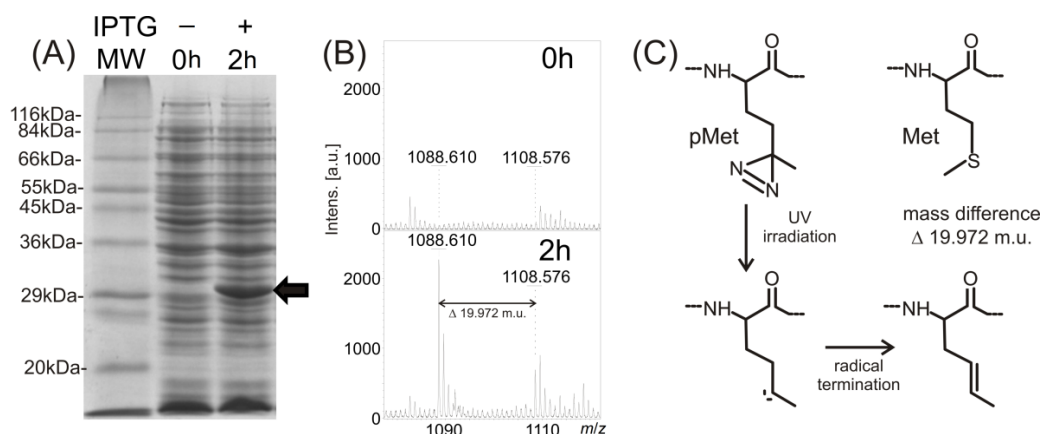
expression was induced through the addition of isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). After two hours of 14-3-3 ζ WT protein expression under the IPTG regime, the protein band of relevant molecular weight was detected by SDS-PAGE of the whole cell lysate (see Figure 1A). A signal at m/z 1108.576 in the MS spectrum of the trypsinized protein band, corresponding to the described tryptic peptide, was also detected (see Figure 1B). Moreover, a signal corresponding to the peptide with the photo-labile methionine analog incorporated into its sequence was detected at m/z 1088.610 (see Figure 1B). As shown in the reaction mechanism (Figure 1C), the laser, with wavelength 337 nm used for the MALDI ionization process, photolyzed the diazirine in the structure of the methionine analog into reactive carbene that in the high vacuum of the MALDI ionization source, produced the termination product of the bi-radical with a double bond, and the MS signal with mass shift 19.972 m.u., compared to the peptide with natural methionine in its sequence.

Table 1. Characterization of purified recombinant human 14-3-3 ζ proteins.

Quantity (unit) purified protein	Protein concentration (mg/mL)	Sequence coverage (%)	Matched/searched peptides
14-3-3 ζ WT	1.45 ± 0.17	74	25/27
14-3-3 ζ S58D	1.27 ± 0.12	69	27/29

Values of protein concentration in the table are averages \pm SD of triplicates; Assay conditions are described in Section 4; Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) peak lists were searched manually against protein sequences with peptide mass tolerance \pm 40 ppm.

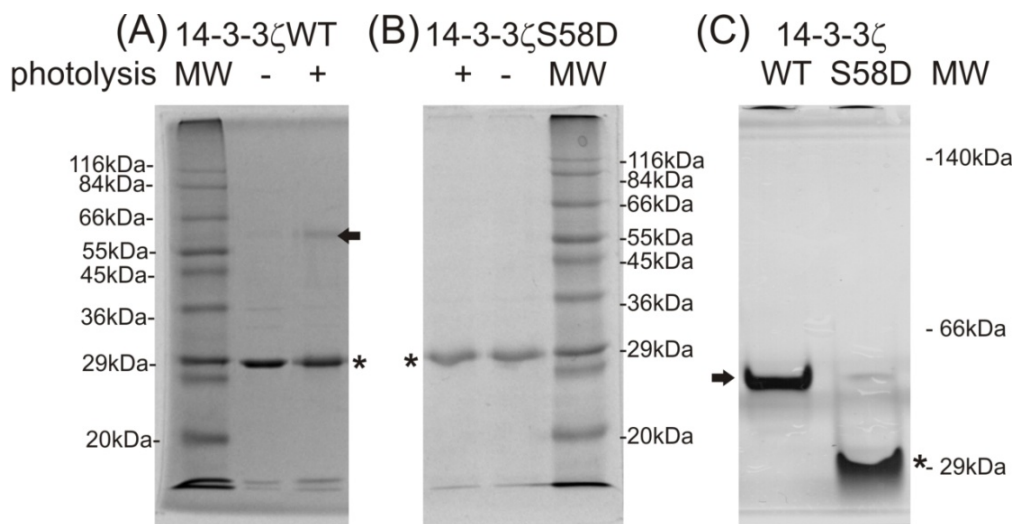
Figure 1. Monitoring of 14-3-3 ζ protein expression using 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (A); incorporation of the photo-labile analog of methionine by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (B), IPTG, β -D-1-thiogalactopyranoside; MW, molecular weight; a diagram of a reaction mechanism of photolysis (C). (A) SDS-PAGE of Sigma wide-range molecular weight standards, 14-3-3 ζ WT expression before induction (0 h) and after induction by β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and following incubation (2 h) (black arrow labels the 14-3-3 ζ WT, Coomassie Brilliant Blue R-250 staining); (B) MALDI-TOF MS monitoring of photo-labile methionine analog incorporation within 14-3-3 expressed protein after 0 and 2 h incubation; (C) schematic of the photo-methionine (pMet) photolysis reaction mechanism and the structural difference between its termination product and natural methionine (Met).



2.2. Photo Cross-Linking Experiments

The photo cross-linking reaction of the photo-labile protein nanoprobe with the incorporated photo-labile methionine analog (zero-length photo cross-linker pMet [2]) forms a covalent homodimeric product of 14-3-3 ζ WT protein (labeled by black arrow in Figure 2A). In agreement with the available literature, the 14-3-3 ζ S58D mutation significantly reduced homodimer production, introducing one negative charge at this site. This mutation mimics Ser58 phosphorylation by PKA and PKB/AKT1, which regulates a 14-3-3 homodimer assembly in the organism [5,9]. The introduction of three *N*-terminal residues from the cleaved histidine-tag sequence, (–2)GSH(0), to both constructs did not produce any unspecific protein–protein interaction for the 14-3-3 ζ S58D construct (Figure 2B). Native electrophoresis was employed to demonstrate the native structure and corresponding homodimer formation of 14-3-3 ζ WT (labeled with a black arrow in Figure 2C) and the monomeric character of 14-3-3 ζ S58D (labeled by an asterisk in Figure 2C). Therefore, no influence from the incorporation of the photo-labile methionine analog within the sequence was detected, and the native character of both proteins was shown.

Figure 2. Monitoring of 14-3-3 ζ homodimer formation by photo cross-linking using SDS-PAGE (A,B) and native PAGE (C). Non-photolyzed and photolyzed proteins on 12% SDS-PAGE (A) 14-3-3 ζ WT and (B) 14-3-3 ζ S58D; (C) non-photolyzed 14-3-3 ζ WT and 14-3-3 ζ S58D on 12% basic native PAGE (Coomassie Brilliant Blue R-250 staining, Sigma wide-range molecular weight standards). The black arrow labels the dimeric 14-3-3 ζ WT and * mark monomeric 14-3-3 ζ molecules.



2.3. The Mass Spectrometry (MS) Analysis of Covalent 14-3-3 ζ WT Homodimeric Product

The photo cross-linking successfully formed a covalent 14-3-3 ζ WT homodimeric product detectable by SDS-PAGE. The MALDI-TOF MS analysis verified the identity of the trypsinized 14-3-3 ζ WT homodimeric product. Moreover, three signals with *m/z* values of 1342.744, 1470.824 and 1998.030, specific to the homodimeric product were detected. No such *m/z* signal was found in the photolyzed protein nanoprobe band corresponding to both monomers (14-3-3 ζ WT and 14-3-3 ζ S58D). Therefore, these three signals correspond to intermolecular cross-links rather than intramolecular ones, and were used to locate the covalently cross-linked regions between two 14-3-3 ζ molecules. MALDI-FTICR

(Fourier transform ion cyclotron resonance) MS with MALDI ionization and high resolution FTICR detection was used to obtain $[M + H]^+$ monoisotopic signals to deduce the unique peptide combination involved in a covalent cross-link.

The values of experimental monoisotopic signals were searched against a database of theoretical monoisotopic masses of cross-linked products: the mass of any 14-3-3 ζ WT tryptic peptide plus the mass of any 14-3-3 ζ WT tryptic peptide minus the mass shift of a 19.972 m.u. eliminated during the photo cross-linking reaction. Similarly to MALDI-TOF analysis, the three signals with m/z values of 1342.7457, 1470.8408 and 1998.0234 were specifically detected in the homodimeric product by MALDI-FTICR analysis. Investigation of these m/z values revealed the corresponding cross-linked peptides (see Table 2). To increase the resolution power, peptide separation by reverse phase liquid chromatography (LC) was used and on-line coupled to nano-electrospray ionization (ESI) and high resolution FTICR detection (LC-ESI-FTICR MS). In this way, the trypsinized 14-3-3 ζ WT homodimeric product was analyzed and the covalently cross-linked regions were located. The obtained dataset of experimental m/z values was automatically reduced to produce output files of monoisotopic masses that were searched against the database of theoretical monoisotopic masses of cross-linked products. Table 2 summarizes all the experimentally determined m/z values and the corresponding mass error of the calculated and experimental m/z values (maximally 2 ppm). The sequences of the covalently cross-linked peptides (in the first and the second molecules of the 14-3-3 ζ WT homodimer) are also shown. The LC-MS analysis confirmed signal values at m/z 1998.0186 with a lower error of acquired mass. In addition to the described m/z signals, both techniques (LC-FTICR MS and MALDI-FTICR MS) also revealed several m/z values corresponding to internally cross-linked peptides or peptides with the termination product of the photolyzed Met analog (e.g., 1881.0186) in the photolyzed 14-3-3 ζ WT monomer, or 14-3-3 ζ S58D monomer, respectively. All these signals were removed from 14-3-3 ζ WT homodimer data sets as intra-molecular cross-links, and were not used for the subsequent analysis of the 14-3-3 ζ WT homodimer interface. Using the MS/MS analysis, the individual m/z signals were further resolved to identify the unique covalent cross-links between two amino acid residues involved in the formation of the homodimer.

Table 2. Identified intermolecular photo cross-linked products in 14-3-3 ζ homodimer between molecule 1 and molecule 2 by * MALDI-FTICR (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-Fourier transform ion cyclotron resonance) or [§] LC-FTICR MS.

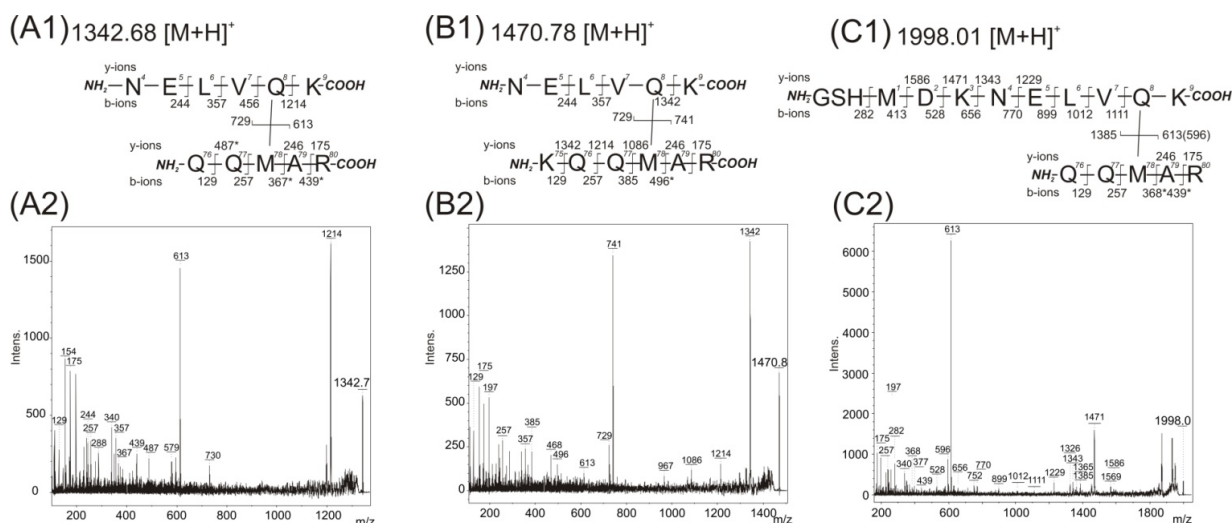
$[M + H]^+$ experimental	Error (ppm)	14-3-3 ζ molecule (1)	14-3-3 ζ molecule (2)
1342.7457 *	1.9	4–9 K.NELVQK.A	76–80 K.QQpMAR.E
1470.8408 *	1.8	4–9 K.NELVQK.A	76–80 K.KQQpMAR.E
1998.0186 [§] /1998.0234 *	0.2 [§] /2.2 *	(–2)–9 .GSHMDKNELVQK.A	76–80 K.QQpMAR.E

The cross-linked amino acids in the peptide sequence are underlined, pM stands for the reactive photo-labile analog of methionine, and the periods in the sequence delimited the identified peptide.

2.4. The MS/MS Analysis of the Covalent 14-3-3 ζ WT Homodimeric Product

The MALDI-TOF/TOF instrument was used to acquire the MS/MS data from the m/z signals shown in Table 2 after off-line separation of peptides. The interpretation of fragment peaks in the MS/MS spectrum allows for the location of interacting amino acid residues covalently connected by the photo cross-linking reaction. The first and the second row in Table 2 show the contact of the pMet78 residue with a residue within the protein sequence at position 4–9 (peptide NELVQK). The contact of pMet78 residue with the Gln8 residue was confirmed by manual interpretation of recorded MS/MS spectra with its value identified at m/z 1342.7457 (Figure 3A). The two major fragment ions are present in this spectrum. The first one, m/z 613 with the complementary ion at m/z 729, corresponds to the fragmentation of the covalent bond between two cross-linked peptides (76)QQpMAR(80) and (4)NELVQK(9). The second most abundant fragment at m/z value at 1214 belongs to b -ions series (244, 357, 456 and 1214), and demonstrates the covalent modification of the Gln8 residue with the peptide (76)QQpMAR(80) (the signals at 244, 357 and 456 correspond to fragmentation of unmodified amino acids in the sequence (4)NELV(7)).

Figure 3. Acquired mass spectrometry (MS)/MS spectra after trypsin digestion of 14-3-3 homodimer band and detected fragment ions corresponding to covalently photo cross-linked structures. The structures of covalently cross-linked Gln8–Met78 (A1), (B1), and (C1) determined from MS/MS daughter ion spectra with detected peaks at m/z 1342.75 (A2), m/z 1470.84 (B2), and m/z 1998.01 (C2), respectively. The residue numbering corresponds with the full-length sequence of the 14-3-3 ζ (UniProtKB database accession number P63104). Intens. means absolute intensity; asterisks marks the secondary fragmentation after inter-peptide cross-linked bond cleavage.



The MS/MS spectrum (Figure 3B with incorporated fragmentation scheme) of the observed m/z value 1470.8408 shows the same group of interacting amino acids, pMet78 and Gln8. The observed m/z difference is explained by the presence of the peptide sequence (75)KQQpMAR(80) formed by trypsin protease miscleavage at the C-terminus of Lys75 residue. Also, two other major fragments are detected in this spectrum. The first one, m/z 741 with a complementary ion of m/z 729, corresponds to fragmentation of the covalent bond between the two cross-linked peptides (75)KQQpMAR(80) and

(4)NELVQK(9). The second value of m/z 1342 belongs to b -ions series (244, 357, 456 and 1342), and again demonstrates the covalent modification of the Gln8 residue with the (75)KQQpMAR(80) peptide (the signals at 244, 357 and 456 correspond to fragmentation of unmodified amino acids in the sequence (4)NELV(7)). The MS/MS spectrum of the identified m/z value at 1470.8408 contains the full y -ion series of (75)KQQpMAR(80) (m/z 1342, 1214, 1086, 246, 175). This indicates the modification of the pMet78 residue by peptide (4)NELVQK(9) (Figure 3B with incorporated fragmentation scheme).

The m/z signal at 1998.0186 in the third row of Table 2 can be interpreted as either of two possible cross-links, because each peptide contains a methionine amino acid. The first probably suggests the previously described pMet78 and Gln8 contact. In the second the pMet1 residue can bind to any residue presented within sequence 76–80. The first interpretation, pMet78 and Gln8 contact, is supported by the MS/MS spectrum acquired from a sample that was photolysed with in the absence of glycerol (Figure 3C). The most abundant fragment ion at m/z 613 with complementary ion at m/z 1385 corresponds to fragmentation of the covalent bond between two cross-linked peptides (76)QQpMAR(80) and (–2)GSHMDKNELVQK(9). The identified fragments (1111, 1012, 899, 770, 656, 528, 413) confirmed unmodified Met1 (covered sequence (–2)GSHMDKNELV(10)). Moreover, a covalent bond between pMet78 and Gln8 with no modification of Met1 is supported by the presence of fragments 1586, 1471, 1343 and 1229. A similar MS/MS spectrum with a corresponding interpretation of amino acid contact was also obtained with the presence of 150 mM NaCl during photolysis.

Additional tests were done, separately, in the presence of two compounds (10% glycerol (v/v) and 150 mM NaCl) during photolysis, because both are usually used in protein samples to protect them during storage at -80°C . No influence of 150 mM NaCl was observed on the MS/MS spectra of all three m/z signals (1342.74, 1470.84 and 1998.01). The presence of 10% glycerol (v/v) had no effect on MS/MS spectra at m/z signal 1342.74 and 1470.84, but surprisingly, was found to have an effect on the MS/MS spectra at m/z signal 1998.01, revealing additional peaks (Figure 4A). The highly abundant fragments in this MS/MS spectrum corroborated the contact between pMet78 and the Gln8 (similarly to Figure 3C). But some of the observed low intensity fragments could also be interpreted as the existence of a covalent bond between pMet1 and Gln77. The fragment with m/z value 633 could suggest the presence of the peptide (76)QQMAR(80) with unmodified methionine, the fragments of the y -ions series (m/z values 282, 858 and 616) could indicate the covalent modification of pMet1 with the peptide (76)QQMAR(80). Similarly, the y -fragments, corresponding to peptides sequenced from C-termini, up to the value of m/z 377 could demonstrate the absence of modification of the peptide (78)MAR(80). However, several abundant fragments cannot be interpreted according to the proposed structures shown in Figures 3C1 or 4A1. Therefore a detailed reanalysis was made of the LC-FTICR MS data at the retention time corresponding to the elution of the m/z signal 1998.0186 to determine if any co-eluted peptides could have contaminated the spectra. The partially co-eluted peptide (12)LAEQAERYDD(pM)AAC(pM)K(27) with an m/z value of 1881.8459 containing two methionine in its sequence (one of which being the photo-analog) and a species with an m/z value of 1861.8735 (with two incorporated photo-analogs) were detected (Table 3). The MS/MS of the species with m/z value 1881.84 was acquired (Figure 4B) and an almost complete b -ion series with m/z values up to Asp21, and with two major fragments with m/z values of 1076 and 1191 was detected. The latter two m/z values were surprisingly also detected in the MS/MS spectrum of m/z signal 1998.01. There is no simple explanation for such an event. Nevertheless, the m/z values of both peptides (m/z 1881.8459

and 1861.8735 are so distinct from those of the interpretation of the MS/MS spectrum for m/z 1998.01 that their mutual contamination can be excluded. Moreover, no fragments with m/z values 282, 616, 633, 858 and 377 were found in the MS/MS spectrum of m/z signal 1881.84. Further study revealed a weak signal of a third co-eluted peptide at m/z 1995.8791 (Table 3 row 3), suggesting the presence of the peptide (12)LAEQAERYDD(pM)AAC(pM)K(27) with a covalently bonded monosodiated glycerol molecule on one of the methionine photo-analogues in the sequence. Because the MS/MS spectrum of m/z 1998.01 was acquired with a wider m/z window of 6 m.u. due to the low intensity of this signal in MS mode, the fragments of the proposed peptide with m/z value 1995.87 should be present in this MS/MS spectrum. The presence of fragments with m/z values 314, 442, 513, 642, 798, 961, 1076 and 1191 strongly confirm the presence of the sequence (12)LAEQAERYDD(21). Therefore, to correctly interpret the obtained MS/MS spectrum of 1998.01, the chromatographic separation of the species with m/z value 1995.87 from the species with m/z value 1998.01 is necessary. Unfortunately, no chromatographic conditions with adequate separation of both signals were found.

Table 3. Photo-initiated cross-linked products (potentially intramolecular or modified) identified in 14-3-3 ζ monomer (molecule 1) by * MALDI-FTICR or ^s LC-FTICR MS.

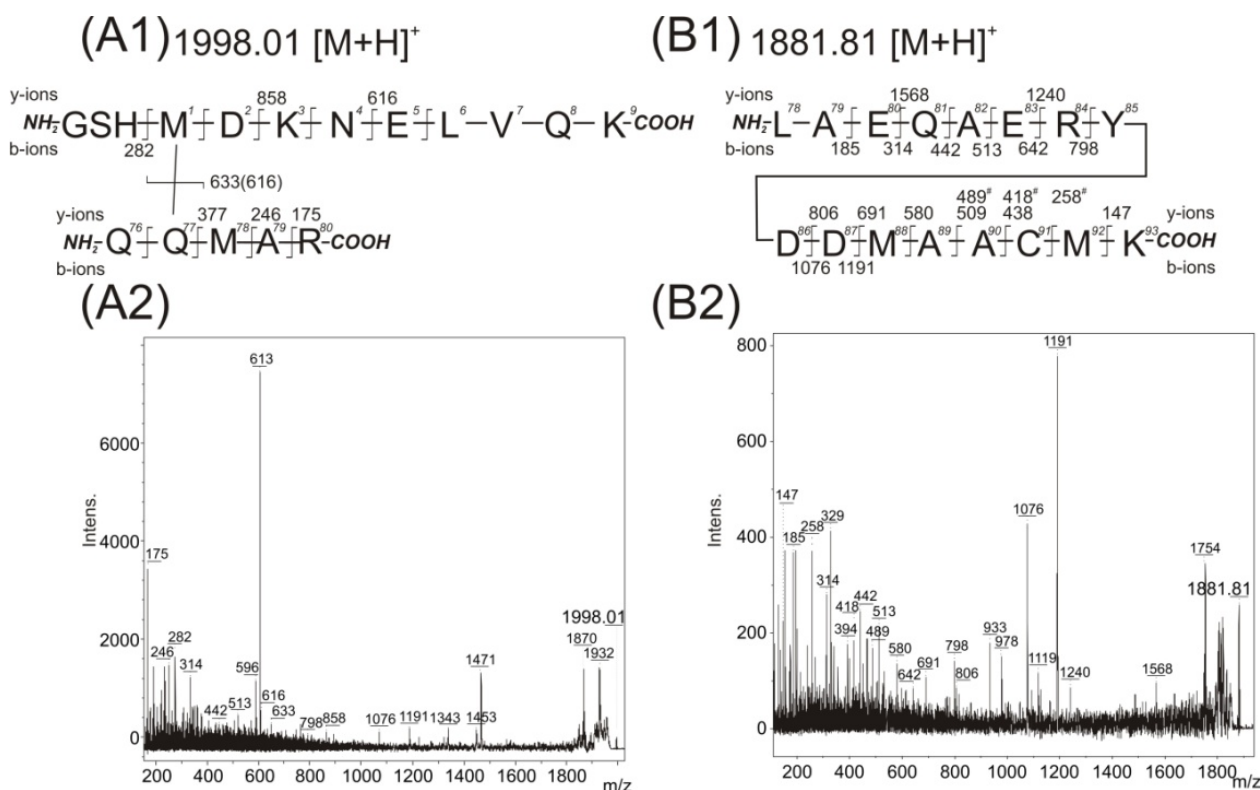
[M + H] ⁺ experimental	Error (ppm)	14-3-3 ζ molecule (1)	14-3-3 ζ molecule (2)
1861.8735 ^{s,*}	1.0 ^s	12-27+CAM K.LAEQAERYDD <u>pM</u> AAC <u>pM</u> K.S	—
1881.8459 ^{s,*}	0.9 ^s	12-27+CAM K.LAEQAERYDD(<u>pM</u>)AAC(<u>pM</u>)K.S	—
1995.8791 ^{s,*}	1.2 ^s	12-27+CAM+GONa K.LAEQAERYDD(<u>pM</u>)AAC(<u>pM</u>)K.S	—

Cross-linked amino acids in the peptide sequences are underlined; pM denotes the reactive photo-labile analog of methionine; (pM) stands for two alternatively incorporated reactive photo-labile analogs of methionine; GONa marks the covalent modification of a photolysed analog of methionine with a monosodiated molecule of glycerol, identified periods in the sequence delimit the observed peptide; CAM marks the modified cysteine (by carbamidomethyl group).

The m/z value 1881.8439 (row 2 of Table 3, Figure 4B) allows for the potential presence of an intramolecular cross-link. However, detailed analysis of the fragments in the acquired MS/MS spectrum revealed no such intramolecularly linked pMet residue and the existence of a mixture of two species (the first species with presence of pMet at position 22, the second one at position 26). The fragments with m/z values of 438, 509 and 580 demonstrated the existence of a double bond on the methionine analog at position 22. On the other hand, the fragments with m/z values of 258, 418 and 489 showed the presence of a double bond on the methionine analog at position 26. The accessibility of one or both Met residues at positions 22 and 26 to the solvent also demonstrate the identification of covalent modification of this residue by glycerol in m/z signal 1995.8791 (row 3 of Table 3).

To summarize, in agreement with previously performed molecular dynamic experiments [7], one detected covalent cross-link: Gln8–pMet78 was found within the 14-3-3 ζ WT homodimer complex interface by MS/MS experiments. At the same time these results verified the applicability of the described methodology (the combination of photo-initiated cross-linking protein nanoprobe and mass spectrometry analysis) to map the protein-protein interface.

Figure 4. Acquired MS/MS spectra of detected peaks at m/z 1998.01 (**A2**) and m/z 1881.87 (**B2**); and structural interpretation of potentially covalently cross-linked Met1–Gln77 (**A1**) and peptide Leu15–Lys30 (**B1**). The residue numbering corresponds with the full-length sequence of the 14-3-3 ζ (UniProtKB database accession number P63104 [10]). Intens. means absolute intensity.



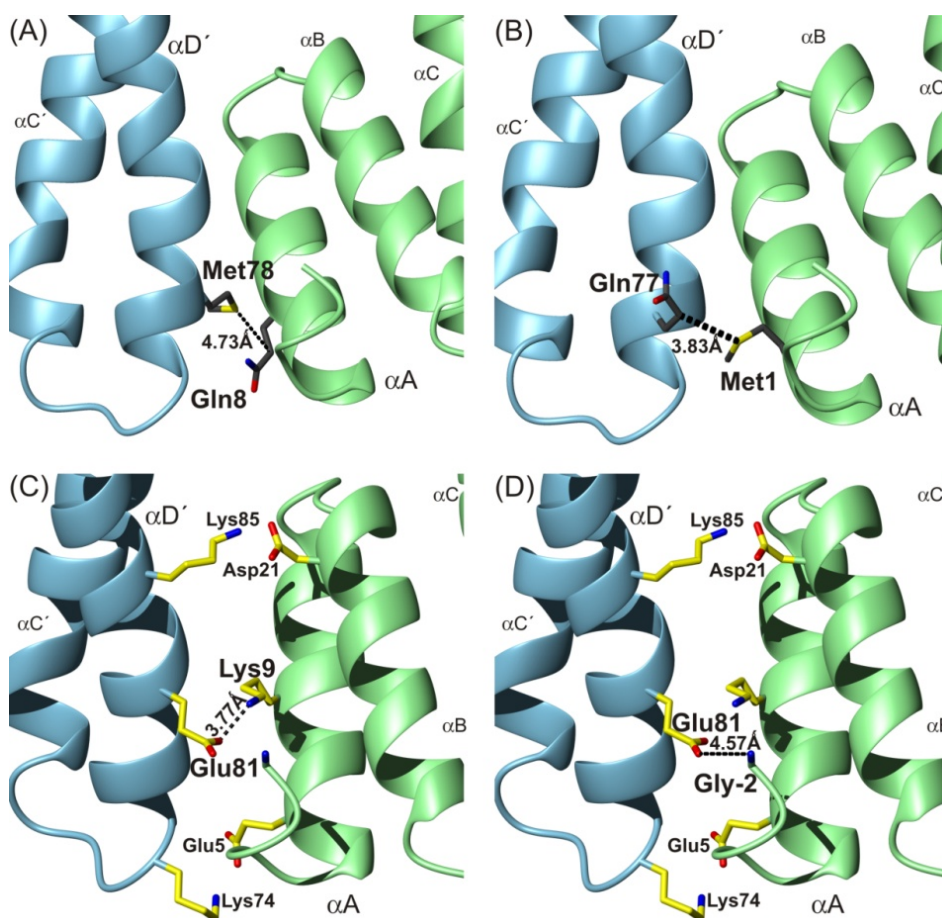
3. Discussion

3.1. Description of Interaction in 14-3-3 ζ WT Homodimer

We have identified two amino acids involved in 14-3-3 ζ WT homodimerization contact (Gln8–Met78) that are situated within two regions previously detected by Hydrogen/Deuterium exchange MS analysis as contact interfaces [7]. These data are also in agreement with previously described findings that the α A'-helix region on the first 14-3-3 molecule interacts with the α D'-helix region on the second molecule [4,11]. Our findings from the photo-initiated cross-linking experiment are also supported by the previously observed salt bridges involving Glu5–Lys74, Arg18–Glu89 and Asp21–Lys85 [6,12] together with Lys9–Glu81 or N-terminal amino-group–Glu81 covalent linkages detected by chemical cross-linking using EDC and MS analysis [7]. To explain the potential structural arrangement and to illustrate the observed interactions, we applied the model of the 14-3-3 homodimer [7] derived from molecular calculations starting from the published 3rdh PDB file (Figure 5, It employs molecular dynamic calculations with constraint distances derived from EDC chemical cross-linking data) [13]. The distances obtained from this model for the covalent photo-initiated cross-links described in this paper (Figure 5A) were 4.73 Å for Gln8(C γ)–Met78(S) and 8.70 Å for Gln8(C α)–Met78(C α). The determined values of atom distances cross-validated the structural data sets obtained from chemical and photo-initiated cross-linking experiments (these employing differing mechanisms of

cross-link formation), and at the same time cross-evaluated both approaches with each other. Therefore, the agreement of both independently acquired results and determined constraint distances with one resulting structure, and the consensus with Hydrogen/Deuterium exchange mass spectrometry support the natural existence of all observed interactions: Gln8–Met78, Lys9–Glu81, Glu81–*N*-terminus.

Figure 5. Illustration (top view) of contacts detected by photo and chemical cross-linking techniques. The detected contacts are shown in the adapted 3rdh X-ray [7] structure of 14-3-3 ζ homodimer using molecular dynamic technique: Gln8–Met78 (A); potential Met1–Gln77 (B); Lys9–Glu81 (C); and *N*-terminal amino group–Glu81 (D). The two salt bridges Glu5–Lys74 and Asp21–Lys85 [6,12] are also pictured in parts (C,D).



3.2. The *N*-Terminal Amino-Group Interaction within 14-3-3 ζ WT Homodimer Interface and Its Hypothesized Role

The previously obtained molecular dynamic results also allow for the discussed contact between Met1 and Gln77 (Figure 5B) (3.83 Å for Met1(S)–Gln77(C γ) and 8.39 Å for Met1(C α)–Gln77(C α)) and our previous results from chemical cross-linking experiments show the interaction of the *N*-terminal amino-group with Glu81 (Figure 5D) [7] and indicate expected *N*-terminal flexibility. However, the interpretation of the MS/MS spectra of the photo cross-link (*m/z* value 1998.01) was not unambiguous and whether such interaction occurs naturally is questionable. The data supporting Met1–Gln77 is weak, because an insufficient number of low intensity fragments confirming the existence of the covalent bond between pMet1 and Gln77 were observed. Moreover, the lack of

glycerol in photolyzed protein (sample with 0 or 150 mM NaCl) led to the disappearance of the fragments with m/z values 282, 616, 633, 858 and 377, which suggests two explanations. The first one proposes the influence of glycerol in solution on *N*-terminal flexibility (the formation of Met1–Gln77 interaction) or, more probably covalent glycerol modification of peptide (12)LAEQAERYDD(pM)AAC(pM)K(27) with exposure of the *N*-terminus to solvent with no intermolecular interaction. Because only a low intensity of fragments was obtained, we are inclined to interpret the potentially found contact between Met1 and Gln77 as statistically low in abundance (higher energy state of a smaller population). We cannot exclude a false positive interpretation of this contact either, due to presence of fragments of co-eluted peptide 12–27 with glycerol modification. Moreover, the both cross-linking experiments (photo and chemical) were performed with 14-3-3 protein constructs (14-3-3 ζ WT and 14-3-3 ζ S58D) that contain three *N*-terminal amino acid residues remaining from the histidine tag, (–2)GSH(0). These residues did not reveal any non-specific interaction on native basic PAGE electrophoresis, or in cross-linking and H/D exchange experiments. But we cannot exclude the possibility that the Met1–Gln77 cross-link does not exist in the native protein without (–2)GSH(0). Therefore, to confirm our previous hypothesis that the transient interactions between the positive charge on the 14-3-3 protein *N*-terminus and any negative amino acid residue occurring in the α C'-helix and α D'-helix regions offer a potential contact within 14-3-3 ζ homodimer complex under the native conditions (e.g., in solution) more experiments have to be performed. Although the functionality of the proposed *N*-terminal amino-group interaction in the 14-3-3 homodimerization process has been previously discussed [7] (*N*-terminal acetylation is thought to increase 14-3-3 isoform half-life by protecting the *N*-terminus from degradation [14], does not have a known effect on 14-3-3 protein functions [15], and can regulate the protein–protein interactions [16]), the experimental evidence of the potential role of acetylated *N*-terminus has not yet been confirmed.

The prepared photo-initiated cross-link protein nanoprobe should provide a suitable tool to explore the structure-function relationships of this 14-3-3 isoform and potentially confirm or exclude the modulatory role of the positively charged *N*-terminal amino-group for the 14-3-3 protein function in regulatory processes in the organism. The reported methodology offers the presence of a reactive species (pMet) at the *N*-terminal position to confirm its interaction within the 14-3-3 homodimer interface or its accessibility to the solvent (through detection of its modification when a quenching agent is introduced into the solvent). However the presence of glycerol in samples with proteins that contain three *N*-terminal amino acid residues remaining from the histidine tag, (–2)GSH(0) did not reveal any detectable covalent modification of pMet1 as was observed for Met22 and Met26 (signal at m/z 1995.87). The only effect reported in the literature on physiological regulation of 14-3-3 was the suppression of its homodimerization induced by specific Ser58 phosphorylation [8,17].

4. Experimental Section

4.1. Materials and Reagents

The expression plasmids for 14-3-3 ζ proteins cDNA were kindly gifted by Tomas Obsil of Charles University in Prague, Czech Republic. Amino acids and reagents for Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-Limited Medium, bovine serum albumin, dithiotreitol (DTT), boric acid, formic

acid, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), methionine, acrylamide, sodium dodecyl sulphate, thrombin and trifluoroacetic acid were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Coomassie Brilliant Blue R-250, EDTA sodium salt, glutathione, iodoacetamide, Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP), and TrisCl were from Fluka Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Bicinchoninic acid and photo-methionine analog (pMet) were from Pierce (Rockford, IL, USA), trypsin from Promega (Madison, WI, USA), acetonitrile and water of LiChrosolv quality from Merck (Darmstadt, Germany), OligoTM R3 Bulk Media from Applied Biosystems by Life Technologies (Grand Island, NY, USA) and Ni Sepharose High Performance from GE Healthcare (Pittsburgh, PA, USA). The other chemicals were obtained from Lachema (Brno, Czech Republic).

4.2. Expression and Purification of 14-3-3 ζ Proteins and Their Characterization

The studied human 14-3-3 ζ proteins, wild type (WT, UniProtKB database sequence P63104 [10]) and its single-amino acid mutant Ser58Asp, denoted as S58D, were prepared from *E. coli* BL21 (gold) cell lysate as the histidine-tagged recombinant proteins as described previously [7,18,19]. Briefly, the chelating and ion-exchange chromatography, Ni Sepharose High Performance chelating media (GE Healthcare), was applied according to the standard protocol and the purification process was finalized by thrombin (Sigma) cleavage of the histidine-tag, followed by separation of this peptide from the protein using the Ni Sepharose column. The resulting 14-3-3 ζ WT and 14-3-3 ζ S58D proteins contain three *N*-terminal amino acid residues remaining from the histidine tag, (-2)GSH(0). The recombinant protein expression was carried out over 2 h of cultivation (4×40 mL DMEM-Limited Medium supplemented with photo-methionine analog (pMet, Pierce) after *E. coli* (BL-21 gold) culture growth in LB-medium till OD_{600nm} values were approximately 0.6 and after rigorous washing by sterile 10 mM phosphate buffer (pH 7.7) with 1 mM EDTA (Fluka).

4.3. 14-3-3 ζ Protein Characterization and Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) Electrophoresis

One-dimensional electrophoresis in the presence of SDS-PAGE was used to prove protein homogeneity and purity [20]. Each protein band was analyzed by mass spectrometry after trypsin (Promega) digestion to confirm the sequences of all proteins [21]. Protein concentrations were assessed using bicinchoninic acid (Pierce) and with bovine serum albumin (Sigma) as a standard [22]. The native state of both 14-3-3 ζ protein (transient homodimeric interaction for WT and monomeric behavior for S58D), was demonstrated by native PAGE electrophoresis using 5 μ M protein concentration containing 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT and 10% glycerol (v/v). The protein mixture was pre-mixed with electrophoretic sample buffer and separated on 12% PAGE in the 90 mM Tris-borate buffer system and 1 mM EDTA (pH 8.0) using 200 V/15 cm for 2 h at 4 °C. The protein bands were visualized using 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250.

4.4. Preparation, Separation and Proteolysis of Cross-Linking Products

The photo cross-linking reaction was carried out in a total volume of 50 μ L with 2 μ M 14-3-3 ζ protein in a solution containing 20 mM Tris-Cl buffer (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT at room

temperature employing 3 min and 15 s of UV-irradiation in a quartz tube (Oriel photolyser equipped with the Hg-Arc lamp emitting at 254 nm). Alternatively, the addition of 10% (v/v) glycerol or 150 mM NaCl was used in the photo cross-linking reaction mixture to test their influence on structure assembly of *N*-terminal part. Immediately after the irradiation, reduced glutathione (150 μ M) was added to halt the cross-linking reaction and the components of the reaction mixture were separated using SDS-PAGE (a 12% polyacrylamide gel). Protein bands were visualized using 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250. The excised protein spots from the SDS-PAGE gel were de-stained, all cysteine residues were modified using Tris(2-carboxymethyl) phosphine hydrochloride and iodoacetamide (Fluka), and processed for MALDI-TOF mass spectrometry by in-gel digestion with trypsin (Promega) as described previously [21]. The mixture of extracted peptides was applied to a peptide micro-trap microcolumn (Michrom Bioresources, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) to remove any salts and buffer components prior to LC-MS analysis.

4.5. LC-FTICR (*Liquid Chromatography-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) MS Analysis

The peptides eluted from the micro-trap were dried in a rotation vacuum concentrator (SPEED-VAC, Savant by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) and dissolved in 5% (v/v) aqueous acetonitrile (Merck) containing 0.1% (v/v) formic acid (Merck) under 15 min sonication. One portion (5 μ L) was loaded onto a reverse-phase column (Magic C18, 0.3 mm diameter, 150 mm long, 5 μ m particle size, 200 Å pore size, Michrom Bioresources) and eluted using the mobile phase gradient: solvent A, 0.1% (v/v) formic acid in 5% (v/v) aqueous acetonitrile; solvent B, 0.08% (v/v) formic acid in 90% (v/v) aqueous acetonitrile; gradient (in % of buffer B), 0% for 1 min, 0%–15% (v/v) over 4 min, 15%–60% (v/v) over 30 min, 60%–100% (v/v) over 5 min; flow rate, 3 μ L/min. Chromatographic separation was performed at 20 °C using an Ultimate 1000 capillary HPLC system (LC Packings, Nieuwerkerk a/d IJssel, The Netherlands). The column effluent was directly loaded into the Solarix 12T FTICR mass spectrometer equipped with a 12 T superconducting magnet (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Positive ion MS spectra were acquired in a broad *m/z* range (300–2000) [23]. Each received monoisotopic mass was automatically matched to the theoretical library of cross-linked, modified and/or unmodified proteolytic products using protein sequences from the UniProtKB database (P63104) with the additional three *N*-terminal residues (–2)GSH(0).

4.6. MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*)-FTICR MS and MALDI-TOF (*Time of Flight*)/TOF MS/MS Analysis

One portion (4 μ L) of the extracted peptides from in-gel trypsin digestion was diluted by aqueous 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid to the desired final concentration 5% (v/v) of aqueous acetonitrile and loaded onto a homemade reverse-phase microcolumn (Oligo™ R3 Bulk Media for Reversed-Phase Chromatography, 0.5 mm diameter, 25 mm long, 30 μ m particle size, Applied Biosystems by Life Technologies, washed with a 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid and separated using step gradient elution as follows: 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in 10%, 20%, 30%, 40% or 80% (v/v) aqueous acetonitrile at 20 °C. The separated fractions were directly spotted onto a MALDI grain-steel target (Bruker Daltonics) and after drying were over-laid with alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (Bruker Daltonics, 5 mg/mL dissolved in 50% (v/v) aqueous acetonitrile containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic

acid). The high resolution MS or MS/MS analyses were acquired on an APEX Qe 9.4T FTICR or Ultraflex III TOF/TOF spectrometer (Bruker Daltonics), respectively. The MS/MS spectra of the cross-linked peptides were interpreted manually.

4.7. Molecular Dynamic Calculations

The computational details for all molecular dynamics calculations were published previously [7]. Briefly, the molecular dynamics package Xplor-NIH 2.29 [24,25] and docking, minimization, and rigid body/torsion dynamics protocols were performed in a similar manner as described previously [26]. As the starting structure for the docking calculations, the X-ray structure of 14-3-3 ζ (PDB code 3RDH) was used [13]. The calculations are based on 119 distance restraints derived from PDB file plus 4 additional distance restraints (Lys9–Glu81, N-terminus–Glu81, Asp21–Lys85, and Glu5–Lys74; so-called “R-6 summed”) from chemical cross-linking [7]. These restrains were allowed to explore the interval of 0 Å to the distance values found in the actual X-ray structure of the protein plus 3 Å. In total, 500 structures were calculated and all structures without distance violations were refined in a layer of explicit water molecules with activated electrostatic potential. The top-ten calculated structures with the lowest potential energy were analyzed with the program MOLMOL 2K.2 [27] and average distances were determined.

5. Conclusions

Two recombinant photo-labile 14-3-3 ζ protein nanoprobe, WT and S58D, were successfully prepared, and partial incorporation of a photo-labile analog of methionine into both proteins was demonstrated by MS analysis. The covalent link of one molecule of WT photo-14-3-3 ζ through its photo-reactive diazirine to another molecule was demonstrated by SDS-PAGE. However, no covalent multimer was detected for the photo-14-3-3 ζ S58D, corresponding to its monomeric character. This agrees with the native behaviour of both proteins under native electrophoresis (monomeric photo-14-3-3 ζ S58D and dimeric photo-14-3-3 ζ WT). The combination of the photo-initiated cross-linking technique with mass spectrometry successfully mapped the regions involved in the homodimerization process of human 14-3-3 ζ regulatory protein and revealed the residues in close proximity to each other that participate in the mutual interaction (Gln8–Met78). Moreover, the existence of the detected covalent photo-initiated cross-links cross-validates our previous data using molecular dynamics calculations based on high resolution chemical cross-linking data and H/D exchange mass spectrometry and the 14-3-3 ζ X-ray crystal structure (PDB 3DHR). The obtained results verify the successful capability of the emerging photo-initiated cross-linking protein nanoprobe methodology to describe the transient interactions in the protein complexes and to map their interface.

Acknowledgments

This work was funded by the Grant Agency of the Czech Republic (P207/12/0627), Charles University, Prague, Czech Republic (GAUK903413 and UNCE204025/2012). Access to MS instrumentation was also supported by grant OPBK CZ.2.16/3.1.00/24023 and IMIC institutional research concept RVO61388971. The authors would like to thank Josef Chmelik for his helpful remarks on molecular

dynamics experiment and structural illustration. The authors would like to thank Michael Fowler for his helpful remarks and proofreading.

Author Contributions

Ptáčková Renata expressed and purified all proteins and performed photolysis and SDS-PAGE; Ječmen Tomáš helped with photolysis and performed MS data mining; Novák Petr acquired LC-ESI-FTICR MS data; Hudeček Jiří and Stiborová Marie helped with manuscript writing and data interpretation; and Šulc Miroslav prepared Native electrophoresis, performed MALDI-FTICR MS, MALDI-TOF/TOF MS/MS analysis, interpreted data and wrote the text of paper.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sinz, A. Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein–protein interactions. *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 663–682.
2. Suchanek, M.; Radzikowska, A.; Thiele, C. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein–protein interactions. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 261–267.
3. Kalkhof, S.; Ihling, C.; Mechtler, K.; Sinz, A. Chemical cross-linking and high-performance Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for protein interaction analysis: Application to a calmodulin/target peptide complex. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 495–503.
4. Jones, D.H.; Ley, S.; Aitken, A. Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and hetero-dimers *in vivo* and *in vitro*: Implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett.* **1995**, *368*, 55–58.
5. Gu, Y.M.; Jin, Y.H.; Choi, J.K.; Baek, K.H.; Yeo, C.Y.; Lee, K.Y. Protein kinase A phosphorylates and regulates dimerization of 14-3-3 epsilon. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 305–310.
6. Gardino, A.K.; Smerdon, S.J.; Yaffe, M.B. Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: A comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 173–182.
7. Haladová, K.; Mrázek, H.; Ječmen, T.; Halada, P.; Man, P.; Novák, P.; Chmelík, J.; Obšil, T.; Šulc, M. The combination of hydrogen/deuterium exchange or chemical cross-linking techniques with mass spectrometry: Mapping of human 14-3-3ζ homodimer interface. *J. Struct. Biol.* **2012**, *179*, 10–17.
8. Woodcock, J.M.; Murphy, J.; Stomski, F.C.; Berndt, M.C.; Lopez, A.F. The dimeric versus monomeric status of 14-3-3ζ is controlled by phosphorylation of Ser58 at the dimer interface. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 36323–36327.
9. Ma, Y.; Pitson, S.; Hercus, T.; Murphy, J.; Lopez, A.; Woodcock, J. Sphingosine activates protein kinase A type II by a novel cAMP-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26011–26017.
10. UniProtKB Database. Available online: <http://www.uniprot.org/uniprot/P63104> (accessed on 12 May 2014).

11. Aitken, A.; Baxter, H.; Dubois, T.; Clokie, S.; Mackie, S.; Mitchell, K.; Peden, A.; Zemlickova, E. Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30*, 351–360.
12. Yang, X.; Lee, W.H.; Sobott, F.; Papagrigoriou, E.; Robinson, C.V.; Grossmann, J.G.; Sundström, M.; Doyle, D.A.; Elkins, J.M. Structural basis for protein–protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17237–17242.
13. Zhao, J.; Du, Y.; Horton, J.R.; Upadhyay, A.K.; Lou, B.; Bai, Y.; Zhang, X.; Du, L.; Li, M.; Wang, B.; *et al.* Discovery and structural characterization of a small molecule 14-3-3 protein–protein interaction inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16212–16216.
14. Martin, H.; Patel, Y.; Jones, D.; Howell, S.; Robinson, K.; Aitken, A. Antibodies against the major brain isoforms of 14-3-3 protein. An antibody specific for the *N*-acetylated amino-terminus of a protein. *FEBS Lett.* **1993**, *331*, 296–303.
15. Fuller, B.; Stevens, S.M., Jr.; Sehnke, P.C.; Ferl, R.J. Proteomic analysis of the 14-3-3 family in Arabidopsis. *Proteomics* **2006**, *6*, 3050–3059.
16. Kouzarides, T. Acetylation: A regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* **2000**, *19*, 1176–1179.
17. Powell, D.W.; Rane, M.J.; Joughin, B.A.; Kalmukova, R.; Hong, J.H.; Tidor, B.; Dean, W.L.; Pierce, W.M.; Klein, J.B.; Yaffe, M.B.; *et al.* Proteomic identification of 14-3-3 ζ as a mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 substrate: Role in dimer formation and ligand binding. *Mol. Cell Biol.* **2003**, *23*, 5376–5387.
18. Obsilova, V.; Herman, P.; Vecer, J.; Sulc, M.; Teisinger, J.; Obsil, T. 14-3-3 ζ C-Terminal stretch changes its conformation upon ligand binding and phosphorylation at Thr232. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4531–4540.
19. Koberova, M.; Jecmen, T.; Sulc, M.; Cerna, V.; Kizek, R.; Hudecek, J.; Stiborova, M.; Hodek, P. Photo-cytochrome b₅—A new tool to study the cytochrome P450 electron-transport chain. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8*, 125–134.
20. Smith, J.A. Analysis of proteins. In *Short Protocols in Molecular Biology*; Ausubel, F.M., Ed.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1995.
21. Sulc, M.; Hodek, P.; Stiborova, M. The binding affinity of carcinogenic *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosomethylaniline to cytochromes P450 2B4, 2E1 and 3A6 does not dictate the rate of their enzymatic *N*-demethylation. *Gen. Physiol. Biophys.* **2010**, *29*, 175–185.
22. Wiechelman, K.J.; Braun, R.D.; Fitzpatrick, J.D. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **1988**, *17*, 231–237.
23. Sulc, M.; Jecmen, T.; Snajdrova, R.; Novak, P.; Martinek, V.; Hodek, P.; Stiborova, M.; Hudecek, J. Mapping of interaction between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b₅: The first evidence of two mutual orientations. *Neuro Endocrinol. Lett.* **2012**, *33*, 41–47.
24. Schwieters, C.D.; Kuszewski, J.J.; Tjandra, N.; Clore, G.M. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J. Magn. Res.* **2003**, *160*, 66–74.
25. Schwieters, C.D.; Kuszewski, J.J.; Clore, G.M. Using Xplor-NIH for NMR molecular structure determination. *Progr. NMR Spectrosc.* **2006**, *48*, 47–62.

26. Clore, G.M.; Schwieters, C.D.; Docking of protein–protein complexes on the basis of highly ambiguous intermolecular distance restraints derived from $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ chemical shift mapping and backbone ^{15}N - ^1H residual dipolar couplings using conjoined rigid body/torsion angle dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2902–2912.
27. Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K. MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 51–55.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Příloha č. 2

Šulc, M., Ječmen, T., **Šnajdrová, R.**, Novák, P., Martínek, V., Hodek, P., Stiborová, M., Hudeček, J.

Mapping of interaction between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5: the first evidence of two mutual orientations

Neuroendocrinology Letters 33 Suppl. 3, 41-7 (2012)

Podíl disertantky na publikaci: izolace mikrosomů z homogenátu králíčích jater, purifikace a charakterizace NADPH:P450 reduktasy a cytochromu b5

Mapping of interaction between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b₅: the first evidence of two mutual orientations

Miroslav ŠULC^{1,2}, Tomáš JEČMEN^{1,2}, Renata ŠNAJDROVÁ^{1,2}, Petr NOVÁK^{1,2},
Václav MARTÍNEK², Petr HODEK², Marie STIBOROVÁ², Jiří HUDEČEK²

¹ Institute of Microbiology Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Czech Republic

² Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

Correspondence to: Assoc. Prof. RNDr. Miroslav Šulc, PhD.
Institute of Microbiology Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i.,
Videňská 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic.
TEL: +420-241062644; FAX: +420-241062156; E-MAIL: msulc@biomed.cas.cz

Submitted: 2012-09-01 *Accepted:* 2012-11-15 *Published online:* 2012-12-26

Key words: **cytochrome P450 2B4; cytochrome b₅; protein-protein interaction;
chemical cross-linking; mass spectrometry**

Neuroendocrinol Lett 2012; **33**(Suppl.3):41–47 PMID: 23353842 NEL330912A05 © 2012 Neuroendocrinology Letters • www.nel.edu

Abstract

OBJECTIVES: The cytochrome P450 (P450) and cytochrome b₅ are membrane hemoproteins composing together with flavoprotein NADPH:P450 reductase a mixed function oxidase (MFO) system. The knowledge of the interaction between P450 and its redox partners within a MFO system is fundamental to understand P450 reaction mechanism, an electron transport from its redox partner and also detoxification of xenobiotics and/or metabolism of endogenous substrates with all positive or negative aspects for organisms.

METHODS: The chemical cross-linking by soluble carbodiimide (EDC) in combination with the liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) has been employed to characterize the contact surface regions involved in the transient interaction between two catalytic domains of P450 2B4 and cytochrome b₅.

RESULTS: The cross-linking reaction was accomplished in an equimolar catalytic complex of P450 2B4:cytochrome b₅ and the covalent hetero-dimers detected on SDS-PAGE electrophoresis were analyzed (after in gel trypsin digestion) using LC-HRMS to identify cross-linked amino-acid residues. The computed in silico models of P450 2B4:cytochrome b₅ complex using amino-acids participating in cross-links (Asp134, Lys139, Glu424 and Glu439 located on a proximal surface of P450 2B4) suggest interpretation that two different types of cytochrome b₅ orientations are present in the studied interaction within a MFO system: the first allowing potential cytochrome b₅ electron donation to P450, the second one inducing cytochrome b₅ modulation of P450 structural changes.

CONCLUSIONS: The results demonstrated the capability of the used experimental approach to map the interaction between P450 and cytochrome b₅ suggesting the formation of multi-meric structures within a MFO system as interpretation of the two observed mutual orientations.

Abbreviations:

DLPC	- dilauroylphosphatidylcholine
EDC	- 1-ethyl-3-[3-dimethyl(aminopropyl)]carbodiimide hydrochloride
LC-HRMS	- liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry
M	- mol/l
m/z	- mass/charge
MFO	- mixed function oxidase
NADPH	- nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)
P450	- cytochrome P450
ppm	- particle per million
SDS-PAGE	- sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TCEP	- Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride

INTRODUCTION

The cytochrome b_5 and cytochrome P-450 (P450) are membrane hemoproteins that compose together with flavoprotein NADPH:P450 reductase a mixed function oxidase (MFO) system localized in the endoplasmic reticulum (Coon 1978). The crucial function of this MFO system consists in the monooxygenation of mainly hydrophobic compounds resulting in detoxification of xenobiotics and/or metabolism of endogenous substrates. Unfortunately the detoxification of some xenobiotics is sometimes reversed to produce compounds more toxic/carcinogenic that are able to modify biomolecules such as DNA, RNA and proteins with all negative consequences for organisms (Guengerich 2005). Thus, P450s are known to be involved in the activation of some chemical carcinogens.

The knowledge of the interaction between P450 and its redox partners (NADPH:P450 reductase and cytochrome b_5) is fundamental to understand not only reaction mechanism of P450 and an electron transport from its redox partner but also to increase our knowledge about metabolism of xenobiotics with all positive or negative aspects for organisms. The cytochrome b_5 has been shown to stimulate, inhibit or have no effect on activity of P450s depending on the P450 isoform, the substrate, and experimental conditions (for references see review Zhang *et al.* 2005). In general, cytochrome b_5 has been suggested to act either as a mediator of electron flow to oxyferrous P450 (Bonfils *et al.* 1981) or as an allosteric modifier of the P450 system (Hlavica 1984) influencing the P450 reaction rate or even the pattern of P450 produced metabolites (Akhtar *et al.* 2005; Kotrbova *et al.* 2011). The studied rabbit P450 2B4 isoform is an orthologue to human P450 2B6 that is involved in oxidation of a number of structurally different carcinogens (e.g. nicotine, aflatoxin B1, styrene, and aminochrysene) and the drugs (e.g. diazepam, cyclophosphamide, iphosphamide, tamoxifen, antipyrine, and lidocaine) (for references see Stiborova *et al.* 2002).

The chemical cross-linking is becoming a valuable tool for the low resolution structure determination of protein complexes in their native states. In combination with mass spectrometry analysis of the cross-linked products it is possible to determine cross-linked resi-

dues in a binary complex of proteins in a reasonable time-scale using small quantities of proteins. Literature data prove this approach to be useful in solving the protein-protein interactions (for references see review Sinz 2006). One of the most used reagent is a “zero length cross-linker” 1-ethyl-3-[3-dimethyl(aminopropyl)]carbodiimide hydrochloride (EDC) that reacts with a carboxylic group on the first protein, forming an amine-reactive O-acylisourea intermediate that may condense with an amine on the second protein yielding a conjugate of the two molecules joined by a stable amide bond. This reaction results in covalent cross-link of these two proteins, without any part of EDC molecule remaining in the final conjugate (Thus, EDC is often called a “zero length cross-linker”). The amide bond formed by this reaction provides a neutral linkage of amino and carboxylic groups of two closely located or interacting amino-acid residues within distances of under 5 Å (Kalkhof *et al.* 2005).

Here we present an application of chemical cross-linking in reconstituted systems containing purified native proteins incorporated into the membrane. The combination of liquid chromatography and high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) provided identification of amino-acid residues participating in the interface between cytochrome b_5 and P450 2B4.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

7-pentoxoresorufin (7-pentyl-7-hydroxy-3-H-phenoxazin-3-one), resorufin and bovine serum albumin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). 1-ethyl-3-[3-dimethyl(aminopropyl)]carbodiimide hydrochloride (EDC), Coomassie Brilliant Blue R-250, dilauroylphosphatidylcholine (DLPC), iodoacetamide, Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) and pyridine were from Fluka Chemical Co. (St. Louis, USA). Bicinchoninic acid was from Pierce (Rockford, USA), trypsin from Promega (Madison, USA), acetonitrile and water of LiChrosolv quality from Merck (Darmstadt, Germany). The other chemicals were obtained from Lachema (Brno, Czech Republic).

Purification of P450 2B4, cytochrome b_5 and NADPH:P450 reductase and their characterization

All proteins were purified from microsomes prepared from rabbit liver using previously described procedures (Sulc *et al.*; 2004, Sulc *et al.* 2010). The animal experiment was conducted in accordance with the Regulations for the Care and Use of Laboratory Animals (311/1997, Ministry of Agriculture, Czech Republic), which complies with the Declaration of Helsinki. Each protein was characterized by SDS-PAGE electrophoresis in combination with mass spectrometry analysis after trypsin digestion to confirm sequences of all pure proteins. The total P450 content was measured based on complex of reduced P450 with carbon monoxide (Omura & Sato

1964), the total NADPH:P450 reductase or cytochrome b₅ content were determined using absorbance of the purified protein at 455 nm or at 412 nm, respectively (Vermilion & Coon 1978). Protein concentrations were assessed using bicinchoninic acid and bovine serum albumin as a standard (Wiechelman *et al.* 1988).

O-depentylation of 7-pentoxoresorufin by purified proteins in reconstituted system

The preparation of reconstituted system in DLPC vesicles as well as estimation of an optimal ratio of P450 2B4 and NADPH:P450 reductase were described previously (Sulc *et al.* 2010). Briefly, the optimal ratio of P450 2B4 and cytochrome b₅ was determined using P450 2B4 specific 7-pentoxoresorufin-O-depentylation activity with 30 µM 7-pentoxoresorufin, 2 µM P450 2B4 and 2 µM NADPH:P450 reductase using a fluorescence spectrometer LS55 ($\lambda_{\text{excitation}}$ 530 nm, $\lambda_{\text{emission}}$ 588 nm, PerkinElmer, Waltham, USA) after 10 min incubation at 37°C in 0.15 mM DLPC vesicles, 50 mM pyridine:HCl buffer (pH 6.5) and 150 mM sodium chloride. Three different P450 2B4:cytochrome b₅ ratios were tested (1:1, 1:2, and 1:4). Experiments with increasing concentration of sodium chloride (0, 50, 150, and 500 mM) were performed in the same system with P450 2B4, NADPH:P450 reductase and cytochrome b₅ in 1:1:1 molar ratio.

Cross-linking, separation, proteolysis of cross-linked products and LC-HRMS analysis

The cross-linking reaction with 0.05 mg/ml of EDC was carried out with 2 µM P450 2B4 and 2 µM cytochrome b₅ in reconstituted system containing 0.15 mM DLPC and 50 mM pyridine-HCl buffer (pH 6.5) for 10 hrs in final volume of 20 µl at 37°C in a shaking incubator. The concentration of NaCl was adjusted in individual samples to 0, 50, 150 and 500 mM. The EDC cross-linking reaction was quenched by 2-mercaptoethanol present in electrophoresis sample buffer, and after boiling and centrifugation the sample was loaded on SDS-PAGE. The electrophoretically separated protein bands were visualized using 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250. The excised protein spots from SDS-PAGE gel were de-stained, all cysteine residues in protein bands were modified using TCEP and iodoacetamide, and processed for MALDI-TOF mass spectrometry by in-gel digestion with trypsin as described previously (Sulc *et al.* 2010). The mixture of extracted peptides was applied on a peptide micro-trap microcolumn (Michrom Bioresources, Auburn, CA, USA) to remove any salt and buffer components prior to LC-HRMS analysis that was described together with MS data analysis previously (Haladova *et al.* 2012).

Protein-protein docking

In silico protein-protein docking of rabbit P450 2B4 with truncated N-terminal membrane part and soluble domain of rabbit cytochrome b₅ was performed using

the flexible docking approach implemented in program HADDOCK with starting structures: a homologous model of truncated rabbit P450 2B4 (Hodek *et al.* 2004) and PDB coordinates 1DO9 from RCSB protein data-bank (Banci *et al.* 2000). This software utilizes information on predicted protein interfaces for ambiguous interaction restraints to drive the docking process. The recommended docking procedure is described in detail elsewhere (de Vries *et al.* 2010). Three approaches how to utilize the experimental data have been applied. In the first one, the docking calculation was performed using all P450 2B4 amino-acid residues (Asp134, Lys139, Glu424 and Glu439) determined in cross-links as active “anchors” of protein-protein interaction. Secondly, the identified covalent cross-link Glu424 (P450 2B4)-Lys24 (cytochrome b₅) was used as a distance constrain of protein-protein interaction. In the last approach, the two pairs of identified covalent cross-links, that do not mutually exclude, Glu424 (P450 2B4)-Lys24 (cytochrome b₅) and Glu439 (P450 2B4)-Lys19 (cytochrome b₅) were given as constrain distances of protein-protein interaction. For all three approaches all charged residues exposed on the both P450 2B4 and cytochrome b₅ surfaces were considered to be passively involved in this protein-protein interaction, no penalty was imposed if a passive residue was not directly involved in the mentioned interaction. In order to extend the number of individual mutual orientations of both proteins the default values of (i) number of structures for rigid body docking, (ii) number of trials for rigid body minimisation and (iii) number of structures for the explicit solvent refinement were doubled and the optional solvated docking was performed.

RESULTS AND DISCUSSION

The methods of chemical cross-linking and mass spectrometry were used for the mapping of protein interface between two membrane proteins, P450 2B4 and cytochrome b₅. To accomplish our goal, the highly purified and well characterized proteins (P450 2B4, cytochrome b₅ and for metabolic activity measurements NADPH:P450 reductase) were obtained from liver homogenate up to the electrophoretic homogeneity employing techniques preserving a native structure of these proteins. Every protein sample was characterized by MS analysis and also by determination of both protein and molar concentrations (for results see Table 1).

All purified proteins were fully active in the reconstituted system (in the P450 2B4 selective O-depentylation of 7-pentoxoresorufin) with determined activity of 33.9±1.9 nmol resorufin/min.nmol P450 in the system with no cytochrome b₅ and phosphate buffer (pH 7.4). The activity determination in the above system at conditions used in chemical cross-linking experiments with optimal pH for EDC chemistry (pyridine buffer, pH 6.5 instead phosphate buffer, pH 7.4) revealed the value of 22.8±1.8 nmol resorufin/min.nmol P450 (100% P450

Tab. 1. Characterization of purified rabbit liver microsomal P450 2B4, cytochrome b₅ and NADPH:P450 reductase.

Quantity [Unit] Purified protein	Protein conc. [mg/ml]	Specific content [nmol/mg]	Identified sequence code	MASCOT score	Sequence coverage [%]	Matched/Searched peptides
P450 2B4	3.8±0.3	11.0	CP2B4_RABIT	288	46	26/28
cytochrome b ₅	1.8±0.2	11.1	CYB5_RABIT	216	61	10/12
NADPH:P450 reductase	1.4±0.2	9.6	NCPR_RABIT	337	45	33/34

Numbers in the table are averages ± S.D. of three parallel experiments. Probability Based MASCOT Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. The scores greater than value 54 were significant ($p < 0.05$). MALDI-TOF peak lists were searched against a SwissProt protein database subset of the Other mammalia taxonomy group using MASCOT™ software with the following settings: enzyme chemistry – trypsin, missed cleavages 1, carbamidomethyl modification of cysteine, variable single oxidation of methionine and peptide mass tolerance ± 50 ppm.

Tab. 2. Identified EDC cross-linked products between cytochrome b₅ and P450 2B4 by LC-HRMS.

[M+H] ⁺	Error [ppm]	P450 2B4 peptide	Cytochrome b ₅ peptide
2479.2371	0.4	134–151 DFGMGKRSVEERIQEEAR	8–10 DVK
2504.2917	1.6	126–140 RFSLATMRDFGMGKR	19–24 KHNSHK
2657.4001	0.1	134–140 DFGMGKR	19–33 KHNSKSTWLILHHK
1719.9058	1.0	435–443 IC ^(CAM) LGEGIAR	19–24 KHNSHK
3117.5918	1.2	423–434+ox-M NEGFM ^(ox) PFSLGKR	20–33 HNHSKSTWLILHHK

underlined amino-acids in peptide sequences label a reactive residue, M^(ox) marks an oxidized methionine and C^(CAM) means a cysteine modified with carbamidomethyl.

2B4 activity) demonstrating a decrease in P450 activity due to presence of pyridine buffer or lower pH value. Then the effect of added cytochrome b₅ was tested. Three molar ratios of P450 2B4:cytochrome b₅ (1:1, 1:2 or 1:4) disclosed 162%, 82%, or 44% of P450 2B4 activity, respectively. In agreement with literature (Zhang *et al.* 2007), the equimolar cytochrome b₅ concentration stimulated the P450 2B4 activity, but two or four fold molar excess of cytochrome b₅ inhibited O-depentylase activity of P450 2B4, probably by competition of cytochrome b₅ at the NADPH:P450 reductase binding site on the P450 2B4 surface.

The chemical cross-linking reaction of cytochrome b₅:P450 2B4 complex using zero-length cross-linker EDC yielded the covalent heterodimeric products detectable on SDS-PAGE (labeled by arrow in the Figure 1). Similar experiment in presence of NADPH:P450 reductase in addition to cytochrome b₅ and P450 2B4 was also performed, but production of a cytochrome b₅:P450 2B4 covalent heterodimeric product was not affected (data not shown). The increasing salt content (0–500 mM of NaCl) did not prevent formation of the cytochrome b₅:P450 2B4 cross-linked

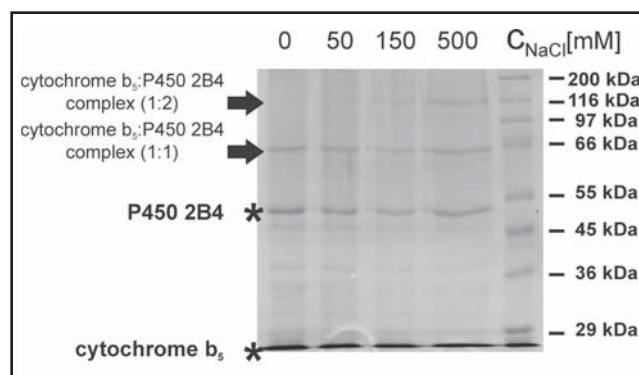


Fig. 1. Monitoring of cytochrome b₅:P450 2B4 heterodimer formation using EDC cross-linker in buffer with increasing concentration of sodium salt (0, 50, 150 and 500 mM) on 8% SDS-PAGE electrophoresis (Coomassie Brilliant Blue R-250 staining, Sigma wide-range molecular weight standards). Arrow labels the heterodimeric products and asterisk marks both monomers.

product and the cytochrome b₅:P450 2B4 complex was still detectable even at the highest concentration (500 mM) of sodium chloride in consistence with metabolic activities. In addition to the control experiment with 150 mM NaCl (100%), three additional concentrations of NaCl were tested (0, 50 and 500 mM), yielding 98%, 118%, and 78% of 7-pentoxo resorufin O-depentylase activity characteristic for P450 2B4, respectively. (All these experiments were carried out with P450 2B4 to cytochrome b₅ molar ratio 1:1). In agreement with published data (Nadler & Strobel 1988; Schenkman *et al.* 1994), the results of both experimental approaches suggest not only the electrostatic character of the studied interaction but also a significant contribution of hydrophobic effects to the formation of the cytochrome b₅:P450 2B4 binary complex.

As we described previously, the incubation of a cross-linker with cytochrome b₅:P450 2B4 produced a mixture of covalently cross-linked heterodimers that probably included different amino-acid residues participating in novel covalent junction between both proteins. The proportion of these orientations statistically depends on presence of each species in the

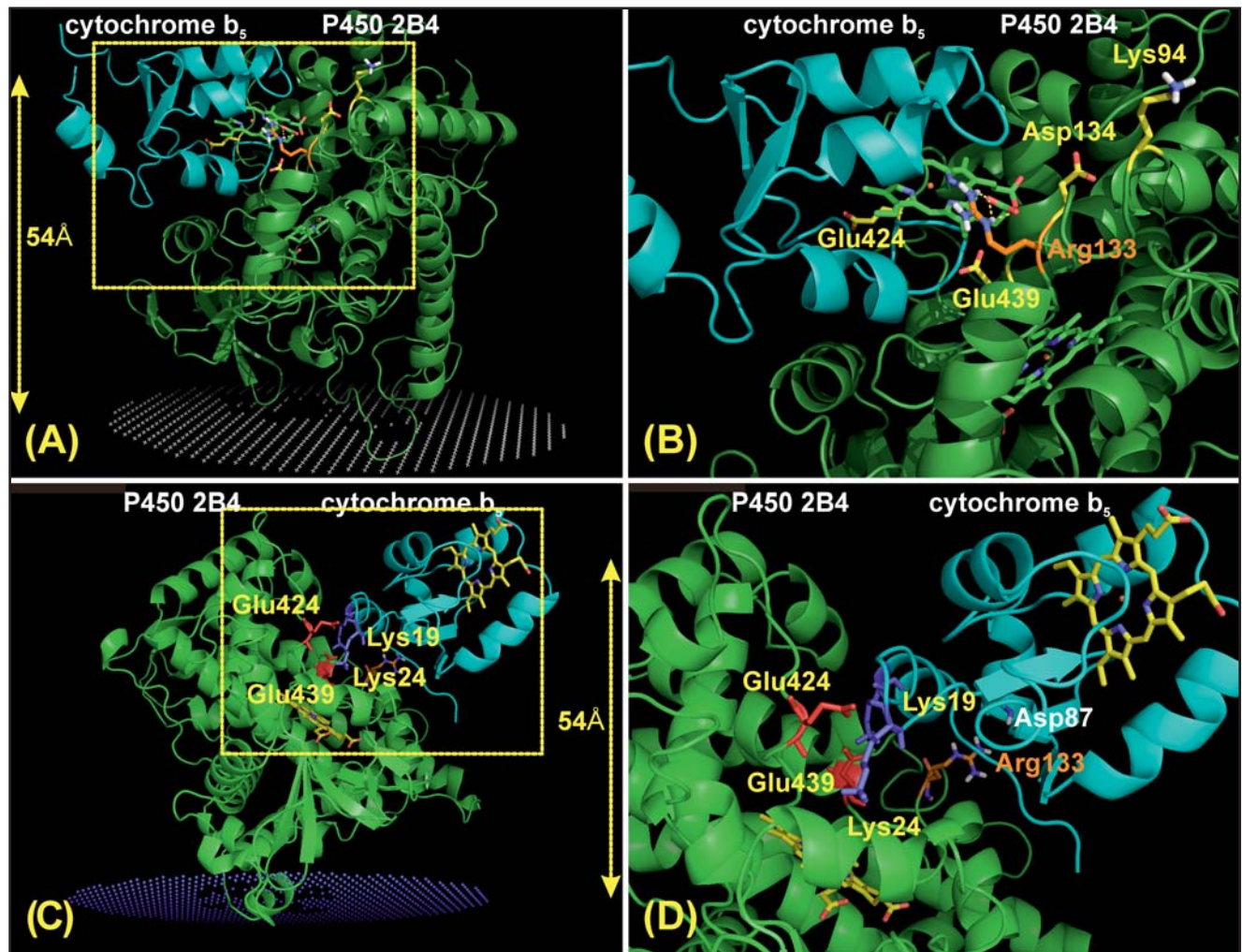


Fig. 2. The structure of the cytochrome b₅:P450 2B4 binary complex predicted by protein-protein docking calculations prepared using PyMOL: (A) using the EDC covalently cross-linked P450 2B4 amino-acid residues (Asp134, Lys139, Glu424 and Glu439) rendered as sticks (yellow), (B) its detailed view within the interface of this complex (the interaction of cytochrome b₅ heme propionate (green) with P450 2B4 Arg133 (orange) is represented as dashed line), (C) using two constrain distances Glu424 (P450 2B4)-Lys24 (cytochrome b₅) and Glu439 (P450 2B4)-Lys19 (cytochrome b₅), and (D) its detailed view within the interface of this complex (also the interaction of cytochrome b₅ heme Asp87 (cyan) with P450 2B4 Arg133 (orange) is shown). The membrane association of the P450 2B4 is positioned at the bottom.

reaction mixture. After quenching the cross-linking reaction, the SDS-PAGE electrophoresis was employed to separate both monomers (cytochrome b₅ and P450 2B4) from the protein band containing the mixture of varied heterodimeric orientations. The proteolysis of cross-linked species to peptides using trypsin, and the analysis of the resulting peptide mixture by mass spectrometry with a high accuracy allowed to determine the a unique combination of two cross-linked peptide sequences that fit to protease specificity (the trypsin generates peptides with C-terminal arginine or lysine) and also to the EDC reaction mechanism (coupling of amino and carboxylic groups). Table 2 presents (in each row) the experimentally observed *m/z* values, mass error of calculated and experimental *m/z* values (maximally 2 ppm) and sequences of the covalently cross-linked peptides. The calculated *m/z* value was

determined as mass of any P450 2B4 trypsinised peptide plus mass of any cytochrome b₅ trypsinised peptide minus mass of water eliminated during the EDC cross-linking reaction. All identified peptide sequences permitted to deduce only one possible combination of the interacted and/or covalently coupled amino-acid residues (underlined amino-acid in Table 2).

Four P450 2B4 amino-acid residues: Asp134, Lys139, Glu424 and Glu439, have been found to participate in the interaction with cytochrome b₅. Interestingly, all four these residues are located on a P450 2B4 proximal surface. Because some of identified covalent cross-links are mutually incompatible and can not be present together in one orientation, we have performed *in silico* simulation of P450 2B4:cytochrome b₅ interaction taking into account four identified P450 2B4 residues (Asp134, Lys139, Glu424 and Glu439) and the whole

cytochrome b_5 surface. Semi flexible half-blind docking approach using contemporary modeling procedures implemented in program HADDOCK (Vries *et al.* 2010) was employed for such a study. The obtained structure shown in Figure 2A revealed the highest HADDOCK score -213.7 ± 17.0 a.u. with a high contribution of electrostatic interactions to the resulting score. These findings are in a good agreement with predominant stabilization of the protein-protein complex by complementary charged residues suitably pre-organized on the contact interface (Im & Waskell 2011; Bridges *et al.* 1998). Our results of chemical cross-linking experiments supported by metabolic assay results studying the effect of increasing ion strength (0, 50, 150, and 500 mM) suggested also a significant contribution of hydrophobic effects to the cytochrome b_5 :P450 2B4 binary complex formation. This argument is supported by the large calculated inter-molecular contact area (the buried surface area in the P450 2B4 and cytochrome b_5 binary complex was calculated as $2050 \pm 80 \text{ \AA}^2$). Probably the extensive and tight van der Waals contacts in this interaction domain can protect the ionic pairs formed from the access of a solvent and in this way stabilize the protein complex against the disruption by high salt concentrations. Although we cannot perform the protein-protein docking in the system associated with a membrane directly, the relative orientation of the P450:cytochrome b_5 binary complex to the membrane can be deduced. We used the proposed membrane orientation available in OPM database (Lomize *et al.* 2006) and obtained approximately the 54 Å distance between a hydrophobic layer of the membrane and C-terminus of cytochrome b_5 in the calculated binary complex (Figure 2A). This distance is lower than potential length of 22 amino acids (a segment between the C-terminal residue of the used soluble domain of rabbit cytochrome b_5 (model 1DO9) and the first hydrophobic residue of its proposed membrane anchor (Trp109)) that allows in a parallel β -sheet structure the maximal distance of 75 Å (3.4 Å/residue). Surprisingly, this docking model suggests the distance of 3.42 Å between nitrogen atom of the lysine amino-group (cytochrome b_5 Lys24) and carbon atom of the glutamic acid carboxylic group (P450 2B4 Glu424). This is in agreement with the proposed maximal distances of 5 Å for that the cross-linker EDC is able to connect amino and carboxylic acid groups (Kalkhof *et al.* 2005). Also the cytochrome b_5 heme propionate interaction with P450 2B4 Arg133 exposed on the P450 proximal surface was found (shown in Figure 2B). The role of P450 2B4 Arg133 was previously discussed suggesting the electrostatic pairing with the P450 heme propionates and movement of this Arg133 towards the proximal surface of P450 2B4 after the substrate/inhibitor binding into P450 cavity (Šulc *et al.* 2008). Therefore, this obtained orientation of the cytochrome b_5 :P450 2B4 complex may reflect the cytochrome b_5 allosteric modulation of P450 metabolic activity or cytochrome b_5 mediation of electron flow to oxyferrous P450 reported

in literature (Bonfils *et al.* 1981; Hlavica 1984). When the identified covalent cross-link Glu424 (P450 2B4)-Lys24 (cytochrome b_5) was used as an individual constrain distance of protein-protein interaction, almost the identical model was obtained (values of top structure: HADDOCK score was -159.1 ± 11.0 a.u., the buried surface area was $1400 \pm 60 \text{ \AA}^2$).

The identified cross-link Glu424 (P450 2B4)-Lys24 (cytochrome b_5) allows only one combination of two simultaneously presented pairs of constrain distances with another cross-link Glu439 (P450 2B4)-Lys19 (cytochrome b_5). The simulation of this interaction resulted in possible orientations fitting both two unique cross-links (Figure 2C). The proposed membrane orientation and a distance between a hydrophobic layer of the membrane and C-terminus of cytochrome b_5 using OPM database are acceptable in this calculated binary complex. But the heme of cytochrome b_5 is oriented out of the P450 2B4 proximal surface, the interaction P450 2B4 Arg133 with cytochrome b_5 Asp87 is presented in a detailed view in Figure 2D, and this P450 2B4:cytochrome b_5 interaction may result only in allosteric modulation of P450 metabolic activity.

Taking together our data, the existence of two mutual orientations of cytochrome b_5 and P450 in their complexes is presented. First, which is depicted in the Figure 2A, represents a commonly accepted cytochrome b_5 binding, when its heme is close to the proximal surface of P450. This orientation allows both cytochrome b_5 roles, the electron donation to P450 as well as the induction of cytochrome P450 structural changes, resulting in the stimulation of its catalytic activity. The second orientation, which takes into account two cross-links, suggests so far unpredicted position of cytochrome b_5 towards P450. In this orientation (shown in Figure 2C) the heme of cytochrome b_5 is exposed to solvent and its distance to P450 does not make any electron transfer possible. The presence of both these two cross-linked orientations found in the P450:cytochrome b_5 heterodimer represents probably only a part of more complex arrangement of both proteins in the membrane environment. This assumption is supported by the existence of a protein band at SDS-PAGE electrophoretic gel with molecular weight close to 116 kDa, probably containing two molecules of P450 and one of cytochrome b_5 (see Figure 1). Although a low yield of this cross-link did not allow more detailed analysis, the mass spectrometry analysis identified both P450 and cytochrome b_5 proteins in this band and supported our speculation that P450 and cytochrome b_5 can form multi-meric structures within the MFO system.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Grant Agency of Czech Republic (P207/12/0627), the Charles University in Prague (UNCE204025/2012), and Institutional Research Project RVO61388971.

REFERENCES

- 1 Akhtar MK, Kelly SL, Kaderbhai MA (2005). Cytochrome b(5) modulation of 17 α hydroxylase and 17-20 lyase (CYP17) activities in steroidogenesis. *J Endocrinol.* **187**: 267–274.
- 2 Banci L, Bertini I, Rosato A, Scacchieri S (2000). Solution structure of oxidized microsomal rabbit cytochrome b5 factors determining the heterogeneous binding of the heme. *Eur J Biochem.* **267**: 755–766.
- 3 Bonfils C, Balny C, Maurel P (1981). Direct evidence for electron transfer from ferrous cytochrome b5 to the oxyferrous intermediate of liver microsomal cytochrome P-450 LM2. *J Biol Chem.* **256**: 9457–9465.
- 4 Bridges A, Gruenke L, Chang YT, Vakser IA, Loew G, Waskell L (1998). Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem.* **273**: 17036–17049.
- 5 Coon MJ (1978). Oxygen activation in the metabolism of lipids, drugs and carcinogens. *Nutr Rev.* **36**: 319–328.
- 6 Guengerich FP (2005). Human cytochrome P450 enzymes. In: Ortiz de Montellano PR, editor. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. New York: Kluwer Press. p. 377–531.
- 7 Hlavica P (1984). On the function of cytochrome b5 in the cytochrome P-450-dependent oxygenase system. *Arch Biochem Biophys.* **228**: 600–608.
- 8 Haladova K, Mrazek H, Jecmen T, Halada P, Man P, Novak P, Chmelik J, Obsil T, Sulc M (2012). The combination of hydrogen/deuterium exchange or chemical cross-linking techniques with mass spectrometry: Mapping of human 14-3-3 ζ homodimer interface. *J Struct Biol.* **179**: 10–17.
- 9 Hodek P, Sopko B, Antonovic L, Sulc M, Novák P, Strobel HW. (2004). Evaluation of comparative cytochrome P450 2B4 model by photoaffinity labeling. *Gen Physiol Biophys.* **23** (2004) 467–88.
- 10 Im SC, Waskell L (2011). The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b5. *Arch Biochem Biophys.* **507**: 144–153.
- 11 Kalkhof S, Ihling C, Mechtler K, Sinz A (2005). Chemical cross-linking and high-performance Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for protein interaction analysis: application to a calmodulin/target peptide complex. *Anal Chem.* **77**: 495–503.
- 12 Kotrbova V, Mrazova B, Moserova M, Martinek V, Hodek P, Hudecek J, Frei E, Stiborova M (2011). Cytochrome b(5) shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy. *Biochem Pharmacol.* **82**: 669–80.
- 13 Lomize MA, Lomize AL, Pogozheva ID, Mosberg HI (2006). OPM: Orientations of Proteins in Membranes database, *Bioinformatics* **22**: 623–5.
- 14 Nadler SG, Strobel HW (1988). Role of electrostatic interactions in the reaction of NADPH-cytochrome P-450 reductase with cytochromes P-450. *Arch Biochem Biophys.* **261**: 418–29.
- 15 Omura T, Sato R (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem.* **239**: 2370–2378.
- 16 Schenkman JB, Voznesensky AI, Jansson I (1994). Influence of ionic strength on the P450 monooxygenase reaction and role of cytochrome b5 in the process. *Arch Biochem Biophys.* **314**: 234–41.
- 17 Sinz A (2006). Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrom Rev.* **25**: 663–682.
- 18 Stiborová M, Borek-Dohalská L, Hodek P, Mráz J, Frei E (2002). New selective inhibitors of cytochromes P450 2B and their application to antimutagenesis of tamoxifen. *Arch Biochem Biophys.* **403**: 41–49.
- 19 Sulc M, Kubickova B, Maslova V, Hodek P (2004). Rabbit Liver Microsomal System: Study of Interaction with Two Model N-Nitrosamines and Their Metabolism. *Gen Physiol Biophys.* **23**: 423–433.
- 20 Sulc M, Hudecek J, Stiborova M, Hodek P (2008). Structural analysis of binding of a diamantoid substrate to cytochrome P450 2B4: possible role of Arg 133 in modulation of function and activity of this enzyme. *Neuro Endocrinol Lett.* **29**: 722–727.
- 21 Sulc M, Hodek P, Stiborova M (2010). The binding affinity of carcinogenic N-nitrosodimethylamine and N-nitrosomethylaniline to cytochromes P450 2B4, 2E1 and 3A6 does not dictate the rate of their enzymatic N-demethylation. *Gen Physiol Biophys.* **29**: 175–185.
- 22 Vermilion JL, Coon MJ (1978). Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Spectral characterization of oxidation-reduction states. *J Biol Chem.* **253**: 2694–2704.
- 23 de Vries SJ, van Dijk M, A.M.J.J. Bonvin AMJJ (2010). The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nat. Protocols* **5**: 883–897.
- 24 Weichelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* **175**: 231–237.
- 25 Zhang H, Myshkin E, Waskell L (2005). Role of cytochrome b5 in catalysis by cytochrome P450 2B4. *Biochem Biophys Res Commun.* **338**: 499–506.
- 26 Zhang A, Im SC, Waskell L (2007). Cytochrome b5 increases the rate of product formation by cytochrome P450 2B4 and competes with cytochrome P450 reductase for a binding site on cytochrome P450 2B4. *J Biol Chem.* **282**: 29766–76.

Příloha č. 3

Ječmen, T., **Ptáčková, R.**, Kavan, D., Černá, V., Hodek, P., Stiborová, M., Hudeček, J., Šulc, M.

Quantification of interactions between cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5 in a functional membrane complex

Neuroendocrinology Letters, přijato do tisku

Podíl disertantky na publikaci: rekombinantní exprese a purifikace cytochromu b5 s inkorporovaným foto-Met, pomoc s finalizací textu publikace před zasláním do redakce

**Quantification of interactions between cytochrome P450 2B4 and cytochrome
b₅ in a functional membrane complex**

**Tomáš Ječmen MSc^{1,2}, Renata Ptáčková MSc^{1,2}, Daniel Kavan PhD^{1,2}, Věra
Černá PhD¹, Prof. Petr Hodek¹, Prof. Marie Stiborová DrSc¹, Prof. Jiří Hudeček¹,
Assoc. Prof. Miroslav Šulc PhD^{1,2}**

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague,
Czech Republic

² Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Czech
Republic

Corresponding author: Assoc. Prof. RNDr. Miroslav Šulc, PhD, Institute of
Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Vídeňská 1083,
14220 Prague 4, Czech Republic, TEL: +420-241062644, FAX: +420-241062156, e-
mail: msulc@biomed.cas.cz

Running headline: The quantification of the cytochrome P450 2B4 and cytochrome b₅
interaction

OBJECTIVES: The mammalian mixed function oxidase (MFO) system participates in
hydroxylation of many hydrophobic endogenous compounds as well as xenobiotics
such as drugs and carcinogens. This biotransformation system, located in a
membrane of endoplasmic reticulum, consists of cytochrome P-450 (P450),
NADPH:P450 oxidoreductase and a facultative component, cytochrome b₅. The

26 knowledge of the interactions among the individual components of the MFO system
27 is essential to understand the relationships between the structure and function of this
28 system that finally dictate a qualitative and quantitative pattern of produced
29 metabolites (e.g. detoxified xenobiotics and/or activated carcinogens). To elucidate
30 the quantitative aspects of the interactions within the MFO system we acquired the
31 photo-initiated cross-linking approach.

32 **METHODS:** The photo-initiated cross-linking employing cytochrome b_5 as a protein
33 nanoprobe [an amino acid analogue of methionine (pMet) was incorporated into
34 cytochrome b_5 sequence during recombinant expression)] was used to quantify its
35 interaction with P450 2B4 in a functional membrane complex. The cross-linking was
36 initiated by UV-irradiation that formed from a pMet photo-labile diazirine group highly
37 reactive carbene biradical. This biradical is able to covalently bind amino acids in the
38 close proximity and to form cross-link. The Met 96 of cytochrome b_5 is situated in a
39 linker region between its catalytic and membrane domains, while Met 126 and 131
40 are located in its membrane domain. The combination of several methods
41 (electrophoresis in polyacrylamide gel, isoelectric focusing, Edman *N*-terminal
42 degradation and amino acid analysis) was employed to characterize the molar ratio
43 of P450 2B4 to cytochrome b_5 in formed covalent cross-links to quantify their
44 transient interactions.

45 **RESULTS:** The successfully produced cytochrome b_5 nanoprobe (with confirmed
46 pMet incorporation by mass spectrometry) stimulates the catalytical activity of P450
47 2B4 when reconstituted with NADPH:P450 oxidoreductase *in vitro* in
48 dilauroylphosphatidylcholine (DLPC) vesicles. The cross-linking was carried out in
49 similar reconstituted system without NADPH:P450 oxidoreductase, and at least three
50 products were separated on 1D SDS-PAGE. The molar ratio of P450 to cytochrome

51 b₅ in each complex was estimated using the above-mentioned combination of
52 methods as 1:1, 1:2 and 2:1.

53 **CONCLUSIONS:** The results demonstrate the utility of cytochrome b₅ nanoprobes to
54 study the interactions in MFO system. Using this nanoprobes, heterodimer with P450
55 2B4 and in addition also heterooligomers were identified, suggesting rather complex
56 interactions of both proteins in this system that suppose the formation of such
57 multimeric structures in the membrane of endoplasmic reticulum.

58

59 **KEY WORDS**

60 Cytochrome P450 2B4; cytochrome b₅; photo-initiated cross-linking; quantification of
61 protein-protein interaction.

62

63 **ABBREVIATIONS & UNITS**

64 DLPC – dilauroylphosphatidylcholine

65 DMEM-LM - Dulbecco's Modified Eagle Medium with absence of methionine and
66 leucine

67 EDC – 1-ethyl-3-[3-dimethyl(aminopropyl)]carbodiimide hydrochloride

68 EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid

69 Da – Dalton

70 hr – hour

71 M – mol/l

72 m.u. - mass unit

73 MS – mass spectrometry

74 *m/z* – mass/charge

75 MFO – mixed function oxidase

76 min – minute
77 NADPH – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)
78 OD_{600nm} - optical density at wavelength 600 nm
79 P450 – cytochrome P450
80 SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
81 sec - second
82 TCEP - Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride
83

84 **INTRODUCTION**

85 The photo-initiated cross-linking of protein nanoprobe is a “zero length cross-
86 linking” experimental technique suitable for the determination of the assembly of
87 various protein complexes in their native states (Ptáčková et al., 2014). A reasonable
88 time-scales and consumption of relatively small quantities of protein are two major
89 advantages of this approach that is an alternative to chemical cross-linking method
90 (Sinz, 2006). To determine structural information of the studied protein complexes,
91 both cross-linking methods are usually combined with mass spectrometry (MS). When
92 both cross-linking approaches are compared, the photo-initiated method is more
93 powerful one due to the absence of limitations in reaction specificity and of
94 restrictions of reaction conditions that are inherent to chemical cross-linkers
95 (Ptáčková et al., 2014). To prepare the protein nanoprobe suitable for photo-initiated
96 cross-linking, the selected amino acid residues from the sequence of protein of
97 interest (e.g. Met or Leu) should be at least partially exchanged to respective
98 analogues containing a photo-labile group (Suchanek et al., 2005). In the next step,
99 the recombinant photo-labile protein nanoprobe has to be produced in a suitable
100 expression system. The reconstitution, incubation and photo-activation of the studied

101 proteins thereafter produce a mixture of covalently cross-linked oligomers. The
102 abundance of cross-linked species, their ratio in these particular complexes and
103 diverse protein orientations statistically depends on the incidence of corresponding
104 transient interactions in the reaction mixture. The applied UV-irradiation decomposes
105 the diazirine functional group in the photo amino acid analogue and generates the
106 highly reactive carbene biradical. It is able to bind to any amino acid residues within
107 distances below 5 Å similarly to a “zero length chemical cross-linker” (Kalkhof et al.,
108 2005). In the case of protein-protein interaction mapping, the next necessary steps
109 are the separation of monomers and oligomers (e.g. by one dimensional sodium
110 dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE)), and their
111 further characterization (e.g. by MS analysis).

112 The two membrane hemoproteins were studied, cytochrome P-450 (P450) and
113 cytochrome b₅, are together with a flavoprotein NADPH:P450 reductase components
114 of a mixed function oxidase (MFO) system located in the membrane of endoplasmic
115 reticulum (Coon, 1978). The hydroxylation of numerous hydrophobic compounds, the
116 crucial function of the MFO system, results in: (i) detoxification of xenobiotics, (ii)
117 metabolism of hydrophobic endogenous substrates, and/or (iii) activation of a variety
118 of chemical carcinogens leading to formation of more toxic/carcinogenic metabolites
119 that are able to modify biomolecules such as DNA, RNA and proteins (Guengerich,
120 2005; Stiborova et al., 2013). During the P450-mediated monooxygenation reaction,
121 the oxygen molecule is activated in the P450 active center by a transfer of two
122 electrons from NADPH and/or NADH molecules catalyzed by NADPH:P450
123 reductase and/or NADH:cytochrome b₅ reductase with cytochrome b₅, respectively.
124 While the transfer of electrons to P450 through NADPH:P450 reductase is supposed
125 to be essential for a P450 reaction cycle, the role of cytochrome b₅ in this process is

still rather enigmatic. The cytochrome b₅ has been suggested to act either as a mediator of electron flow to oxyferrous P450 (Bonfils et al., 1981) or as an allosteric modifier of the P450 system (Hlavica, 1984). During its action, the P450 reaction rate can be influenced (stimulated, inhibited and not affected) by cytochrome b₅ (Schenkman, and Jansson, 2003; Kotrbova et al., 2009) and, moreover, even the pattern of metabolites produced by P450 might be modified by this protein (Kotrbova et al., 2011). The P450 2B4 enzyme studied in this work is a rabbit orthologue of human P450 2B6 that is involved in oxidation of a number of structurally different carcinogens (e.g. nicotine, aflatoxin B1, styrene, and aminochrysene) and drugs (e.g. diazepam, cyclophosphamide, iphosphamide, tamoxifen, antipyrine, and lidocaine) (for references see Stiborova et al., 2002).

Here we present an application of photo-initiated cross-linking in reconstituted systems assembled from the purified proteins (P450 2B4 and cytochrome b₅) *in vitro* incorporated into the artificial membrane of dilauroylphosphatidylcholine (DLPC)-mediated liposomes. The cytochrome b₅, which was used as a protein photo-initiated cross-linking nanoprobe, contains three methionines in its amino acid sequence. They were partially substituted by a methionine analogue containing a photo-labile diazirine functional group (Suchanek et al., 2005). These methionine residues are found at position 96 that is located in linker domain and at the positions 126 and 131, which are situated within C-terminal transmembrane domain (Koberova et al., 2012). Using the combination of several techniques, the quantification of both enzymes, ratio of cytochrome b₅ and P450 2B4, participating in formation of oligomeric structures was determined.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals. Amino acids and reagents for Dulbecco's Modified Eagle Medium with absence of methionine and leucine (DMEM-LM), bovine serum albumin, dithiotreitol (DTT), isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), acrylamide, bis-acrylamide, sodium dodecyl sulphate, trifluoroacetic acid, 7-pentoxoresorufin (7-pentyl-7-hydroxy-3-H-phenoxazin-3-one), and resorufin purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Coomassie Brilliant Blue R-250, dilauroylphosphatidylcholine (DLPC), EDTA sodium salt, iodoacetamide, Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP), and potassium phosphates were from Fluka Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Bicinchoninic acid and photo-methionine (L-2-amino-5,5-aziridinehexanoic acid, pMet) were from Pierce (Rockford, IL, USA), acetonitrile and water of LiChrosolv quality from Merck (Darmstadt, Germany), DEAE-Sepharose CL4B from GE Healthcare (Pittsburgh, PA, USA), OligoTM R3 Bulk Media from Applied Biosystems by Life Technologies (Grand Island, NY, USA), trypsin and chymotrypsin from Promega (Madison, WI, USA). All other chemicals were of analytical grade or better.

Purification of P450 2B4, cytochrome b₅ and NADPH:P450 reductase and their characterization. All proteins were prepared and purified by procedures described previously (Sulc et al., 2010). Each protein was characterized by combination of 1D SDS-PAGE with mass spectrometry (MS) after trypsin (for P450 and NADPH:P450 reductase) or chymotrypsin (for cytochrome b₅) digestion to confirm sequences of all pure proteins (Sulc et al., 2009). The total P450 content was measured as the complex of reduced P450 with carbon monoxide (Omura and Sato, 1964), the total contents of NADPH:P450 reductase or cytochrome b₅ were determined using absorbance of the purified protein at 455 nm or at 412 nm, respectively (Vermilion and Coon, 1978). Protein concentrations were assessed using bicinchoninic acid and bovine serum albumin as a standard (Wiechelman et al., 1988). The preparation of

reconstituted system in DLPC vesicles as well as estimation of an optimal ratio of P450 2B4, cytochrome b₅ and NADPH:P450 reductase were described previously (Sulc et al., 2012).

Recombinant expression and purification of cytochrome b₅ protein nanoprobe. The recombinant protein expression was carried out in *E. coli* (BL-21 DE-3 GOLD) transformed with the expression vector pET22b. After growth at 37°C in LB-medium till OD_{600nm} value approximately 0.6 and rigorous washing by sterile 10 mM phosphate buffer (pH 7.4, at 6 °C), the cells' cultivation continued over 1 hr in DMEM-LM supplemented with photo-methionine analog (pMet, Pierce) and L-leucine. The isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (1 mM) was added prior to the induction of cytochrome b₅ expression (Koberova et al., 2012). The cells were harvested by centrifugation, and lysed using sonication, the content of prosthetic groups was boosted by hemine donation and microsomal fraction was solubilised by detergent. The protein was prepared by the combination of ion-exchange chromatography and detergent substitution as described previously (Kotrbova et al., 2009).

Photo-initiated cross-linking, separation, proteolysis of cross-linked products and MS analysis. The cross-linking reaction was carried out with 2 μM P450 2B4 and 8 μM cytochrome b₅ in a reconstituted system containing 0.3 mM DLPC and 50 mM phosphate buffer (pH 7.4). After DLPC vesicles preparation (sonication of DLPC film in a tube with buffer till clear solution using probe, 60 W) the both proteins were added and pre-incubated for 1 hr at 6 °C in final volume of 20 μl. The photo cross-linking was carried out at ambient temperature by UV-irradiation for 195 sec in a quartz tube (Oriol photolyser equipped with the Hg-Arc lamp emitting at 254 nm). The cross-linking reaction was quenched by 2-mercaptoethanol present in the

electrophoresis sample buffer, and after boiling and centrifugation the sample was loaded on SDS-PAGE. The electrophoretically separated protein bands were visualized using silver staining. The protein spots excised from the gel were destained, all cysteine residues in protein were modified using TCEP and iodoacetamide, and processed for MALDI-TOF mass spectrometry by in-gel digestion with trypsin as described previously (Sulc et al., 2012). To remove any salts and buffer components, the mixture of extracted peptides was applied on a peptide micro-trap microcolumn (Michrom Bioresources, Auburn, CA, USA) prior to MS analysis together with the process of MS analysis as was described previously (Haladova et al., 2012).

Cytochrome b₅ nanoprobe-P450 cross-links quantification: 1D/2D-electrophoresis, N-terminal Edman degradation, amino acid composition analysis. The products of cross-linking reaction were separated employing 1D SDS-PAGE using 12% polyacrylamide gel or 2D SDS-PAGE combining 3-10NL IPG strip (13 cm, GE Healthcare, USA) with 10% polyacrylamide gel. For 1D SDS-PAGE, the gel was loaded with 20 µl of the cross-linking reaction mixture. In the case of 2D SDS-PAGE, 80 µl of cross-linking reaction mixture was precipitated with 500 µl of cold acetonitrile at -20 °C, and after centrifugation the whole pellet was dissolved in loading buffer. The both electrophoretic gels were visualized using silver staining. The N-terminal Edman degradation was performed with protein bands electro-blotted at the PVDF membrane at PROCISE 491 instrument (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA) according to instruction manual. The amino acid composition analysis was performed using hydrolysis by 4.7 N HCl at 110 °C for 24 hrs in a sealed glass tube for both samples of protein bands, pieces of destained polyacrylamide gel or incised PVDF membrane of electro-blotted proteins visualized with Ponceau-Red (1% in

water (w/v)). The hydrolyzed mixture of amino acids from proteins excised from a PVDF membrane was dried on Jouan RC 10.10. SpeedVac and reconstituted by vortexing in 20 μ l of 20 mM constant-boiling HCl. After the reconstitution step, 60 μ l AccQ Fluor Borate buffer and 20 μ l AccQ Fluor reagent (Waters Corporation, MA, USA) were added and the amino acids were incubated at 55 °C for 10 min. A mixture of the derived amino acids was analyzed using Waters AccQ Tag column on Beckman Coulter HPLC Gold chromatograph with Merck-Hitachi F-1080 fluorescence detector (excitation 250 nm, emission 395 nm). Data were collected and evaluated employing Data Apex CSW32 chromatography software.

RESULTS AND DISCUSSION

The photo-initiated cross-linking was used for the mapping and quantification of protein-protein oligomers formed between two membrane proteins, P450 2B4 and cytochrome b₅. The *in vitro* reconstitution of highly purified and well characterized proteins (P450 2B4, cytochrome b₅ and for metabolic activity measurements also NADPH:P450 reductase) was used to accomplish our goal.

The recombinant cytochrome b₅ nanoprobe (protein concentration of 3.4 mg/ml, specific content of 66 nmol/mg of protein) was prepared from *E. coli* by cells lysis, microsome preparation, hemine donation, detergent treatment, and by ion-exchange chromatography using the gradient of KCl concentrations for elution of proteins (DEAE-Sepharose, GE Healthcare). Finally, rechromatography of the cytochrome b₅ nanoprobe for detergent substitution to obtain an electrophoretically homogenous protein was carried out (see Figure 1A). This final preparation of cytochrome b₅ was additionally characterized by its UV-VIS spectrum (see Figure 1B). The characteristic absorbance maximum at 412 nm was used to determine its molar concentration.

The decrease in absorbance at 280 nm was used to monitor elimination of the detergent. To confirm the identities and purity of all protein preparations, they were characterized by MS analysis (data not shown). In the case of recombinantly expressed cytochrome b₅, amount of incorporated pMet in the protein sequence was also determined (it was approximately 50%, see Figure 1C). The electrophoretically homogenous NADPH:P450 reductase and P450 2B4 (protein concentration 4.5 mg/ml, specific content 1.8 nmol/mg) were prepared as described previously (Sulc et al., 2012). All purified proteins in the reconstituted system were fully enzymatically active (measured as the P450 2B4 selective O-depentylation of 7-pentoxoresorufin), having activity of 33.9 ± 1.9 nmol resorufin/min.nmol P450 (the value used as the control, 100% P450 2B4 activity) in the system without presence of cytochrome b₅ in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4). The effect of added cytochrome b₅ to the system on P450 2B4 enzyme activity was also analyzed; three molar ratios of P450 2B4:cytochrome b₅, 1:1, 1:2 or 1:4, disclosed 182%, 265%, or 204% of P450 2B4 activity, respectively. This corresponds to the results reported by Im et al., (2011), the stimulation of the P450 2B4 activity by increased concentration of cytochrome b₅ was observed, demonstrating the full biological functionality of the nanoprobe.

The activity experiments in the above mentioned system underlines the advantages of photo-initiated cross-linking compare to the chemical cross-linking (Sulc et al., 2012). The conditions used previously for chemical cross-linking experiments dictated by optimal pH value for EDC chemistry (1-ethyl-3-[3-dimethyl(aminopropyl)]carbodiimide hydrochloride, pyridine buffer, pH 6.5) decreased the enzyme activity to 67% of P450 2B4 control activity due to presence of pyridine buffer or lower pH value (Sulc et al., 2012). Another advantage of the photo-initiated cross-linking in addition to its compatibility with physiological conditions consists in

shorter total time of the cross-linking reaction (in range of minutes instead of hours). Finally, an important advantage of the photo-initiated cross-linking is the unselective reactivity of the highly reactive carbene biradical and the resulting non-specific covalent bond cross-linking. In contrast, for chemical cross-linkers the formation of a new bond is directed by the chemically determined specificity of the used cross-linker (e.g. EDC forms neutral linkage between amino and carboxylic groups). Both these features make it possible to use the photo-initiated cross-linking even for fixation of the non-covalent transient protein-protein complexes within the membrane of the MFO system.

The photolysis of pre-incubated vesicles containing P450 2B4 enzyme with cytochrome b_5 protein nanoprobe produced a mixture of covalently cross-linked oligomers. It most probably intercept the distribution of their different ratios and novel covalent junctions between both proteins. The proportion of the orientations statistically depends on the presence of each species in the reaction mixture. The electrophoresis (1D SDS-PAGE) of the photolytic product has shown, in addition to the bands of both monomers (cytochrome b_5 and P450 2B4), three newly formed protein bands with lower mobility (see Figure 2A). The peptide mass fingerprinting approach revealed the presence of m/z values corresponding to peptides generated by trypsin digestion from both proteins in all three bands (data not shown), thus confirming that they correspond to heteromeric complexes.

However, the question remains concerning the molar ratio of both proteins in each of the cross-linked species to suppose the situation how the both enzymes of the MFO system might be organized in the membrane in organisms.

As the first clue, we may use the deduced molecular weights (MW) of each protein band detected using 1D SDS-PAGE which are 68 ± 5 kDa, 88 ± 5 kDa and

125±5 kDa. We may calculate the expected values for observed complexes on the basis of MW of individual constituents – 15 kDa for cytochrome b₅ and 56 kDa for P450 2B4. The first and the second observed value can be thus easily and rather unequivocally interpreted as P450 2B4:cytochrome b₅ complexes with molar ratios of 1:1 (expected MW of 71 kDa) and 1:2 (expected MW of 86 kDa), respectively. Alas, the third deduced MW value of 125 kDa cannot be easily interpreted. It can correspond to several different heterooligomers; the P450 2B4:cytochrome b₅ complex with molar ratio 2:1 (expected MW of 127 kDa), 1:4 (theoretical MW of 117 kDa), or perhaps even 1:5 (theoretical MW of 132 kDa). However, we cannot completely exclude the theoretical possible complex with molar ratio 1:3 (expected MW of 102 kDa), because the cross-linked species may display aberrant mobility in 1D SDS-PAGE.

Therefore, to distinguish between the possible complexes discussed above, 2D SDS-PAGE was employed (see Figure 2B). This method allows to determine not only MW of protein band, but also the value of its isoelectric point (pI). These isoelectric points should differ for each complex, reflecting their different composition. The theoretical values of MW and pI were calculated using Expasy tools Compute pI/Mw (Bjellqvist et al. 1993). The P450 2B4:cytochrome b₅ complex with molar ratio 2:1 has the theoretical pI 8.19, the complex with molar ratio 1:3 the theoretical pI 5.94, for complex 1:4 the value of theoretical pI is 5.79, and for molar ratio of 1:5 the pI value is theoretically 5.69. Although the 4 times higher amount of cross-linked reaction was used for 2D SDS-PAGE than was applied at 1D SDS-PAGE, only silver staining was able to visualize four protein spots of the oligomeric complexes (see arrows in Figure 2B). The loss of material was probably caused during acetonitrile precipitation or insufficient adsorption of sample into IPG. Unfortunately, the higher

amount of cross-linking mixture used for acetonitrile precipitation revealed very low resolution of electro-focusing process at 2D SDS-PAGE, and therefore could not be used.

Examining the results of 2D SDS-PAGE depicted at Figure 2B, we should start with the fact that both monomers are not visible in the gel, because their pI values are out of the separation range (P450 2B4 theoretical pI 9.01, cytochrome b₅ theoretical pI 5.14). The most intense broad band with MW corresponding to 68±5 kDa has estimated pI 6.5-6.7±0.5, confirming its P450 2B4:cytochrome b₅ molar ratio 1:1 (theoretical pI 6.74). The two additional spots with similar MW (90±5 kDa and 93±5 kDa) correspond to the second band in 1D SDS-PAGE and have estimated pI values of 5.9±0.5 and 6.1±0.5, respectively. Therefore, these two species probably may be ascribed to different orientations of the covalent complex containing P450 2B4:cytochrome b₅ in the molar ratio 1:2 (theoretical pI 6.18, MW 86 kDa). The small apparent differences are likely to reflect the aberrant behavior of large complexes in SDS electrophoresis. The proteolysis of these three cross-linked species to peptides using trypsin and the following MALDI-TOF MS analysis of the resulting peptide mixtures confirmed the presence of both P450 2B4 and cytochrome b₅ (detected *m/z* values corresponding to peptides generated by trypsin from both proteins, data not shown). Unfortunately, the last spot (corresponding to the highest molecular weight band in 1D electrophoresis) has very low intensity. Nonetheless, the estimated pI value of 7.9-8.0±0.5 and MW of 125±5 kDa match the values for the complex with P450 2B4:cytochrome b₅ molar ratio 2:1 (theoretical pI 8.19 and MW 127 kDa), but the lower quality of these data with very low intensity and quality of corresponding MS signals (no detectable *m/z* signal of peptide generated from both protein) dictates certain restraint.

To quantify the composition of oligomeric P450 2B4:cytochrome b₅ covalent complexes, the determination of amino acid in one cycle during the *N*-terminal Edman analysis was employed. Although the 8 times higher amount of cross-linking reaction mixture (compared to 1D-SDS-PAGE) was used for the electro-blotted protein bands with following Edman analysis, no positive result was obtained for any of the analyzed species as the analyzed amounts were under sensitivity limits of this methodology approach. To test the sensitivity of this approach the simulation of an equimolar P450 2B4:cytochrome b₅ mixture was performed. The minimal molar concentration approximately about 0.3 μ M per protein revealed the positive result of quantification. To increase intensity of signal and overcome the low detection limit of *N*-terminal Edman degradation (only the amount of one amino acid corresponding to a molar amount of total protein is detected during one cycle), total hydrolysis of protein bands separated by 1D SDS-PAGE with following amino acid modification and HPLC separation was employed. As it is shown in Figure 3A(i), almost all amino acid species from the used standard mixture were separated with base-line resolution. The proteolysis of polyacrylamide gel pieces containing protein by hydrochloric acid resulted in a production of a high amount of ammonia from polyacrylamide that is in extreme over-abundance to amino acids of protein sample and therefore interfered during separation and dramatically decrease the sensitivity of applied HPLC method. To eliminate this interference, the total proteolysis of electro-blotted protein band at a PVDF membrane was used and HPLC chromatograms of all three oligomeric complexes are shown in Figure 3B [species having MW of (i) 68 \pm 5 kDa, (ii) 88 \pm 5 kDa, and (iii) 125 \pm 5 kDa]. In each analyzed protein band a total area under curve (AUC) was determined for each amino acid. Every value of AUC was normalized using calculated number of particular residues of

corresponding amino acid present in proposed specie. To calibrate the method for each individual amino acid, the standardization of its normalized AUC area in complex using determined normalized AUC area for the same amino acid in one of the analyzed monomer with known number of amino acid residues (X for cytochrome b_5 or Z for P450 2B4) was performed. The value of this standardized ratio determined by this method should be stable for any heterooligomeric complex properly assessed stoichiometry of two proteins with known sequence (amino acid composition). As shown in Table 1, only expecting the molar ratio of P450 2B4:cytochrome b_5 2:1, we obtained the correct values for both calibrations, X or Z values, for all tested amino acids. This observation significantly supports the proposed composition of the P450 2B4:cytochrome b_5 heterooligomeric complex with MW of 125 ± 5 kDa, establishing its molar ratio as 2:1. Other proposed compositions significantly differ in one or more determined values of X or Z (shown as bold numbers in Table 1) and thus might be excluded.

The question, however, is how to interpret the obtained results. Can we extract any information from heterooligomer complex formation? Although much information was previously described, the structural details and functional relevance of the P450-membrane and a mutual protein-protein interaction within the MFO system are not fully understood. It is well known that both cytochromes are tightly anchored in the membrane bilayer by a single transmembrane helix. For the P450 protein, it was proposed that the first 66 amino acids from *N*-termini form two segments (Nelson and Strobel, 1988) and together with this *N*-terminal alpha helix of the hydrophobic F-G loop could interact with the membrane - a dependence of P450 interaction on the membrane composition was observed (Pernecky et al., 1993). The cytochrome b_5 has been shown to incorporate into lipid bilayers with its *C*-terminal transmembrane

domain that contains two methionine residues at position 126 and 131. Recently, the distortion of transmembrane orientation for both proteins was determined (for P450 17° and for cytochrome b₅ 14° tilt from the lipid bilayer normal were determined using solid-state NMR) (Yamamoto et al., 2013a). This tilted orientation of both transmembrane domains in the lipid bilayer probably allows the interaction between them neither significantly altered the helical structure of the transmembrane domain of cytochrome b₅ nor does it alter its geometry. This interaction could be essential in restricting the motion of the cytochrome b₅ soluble domain to those orientations that will result in a productive complex with P450 (Yamamoto et al., 2013b). Rotation diffusion studies of P450 using photoselection techniques also previously revealed restricting the motion of cytochrome b₅ and proposed particularly oligomeric structures and co-operativity between individual enzymes (Stier et al., 1991). Therefore, for the MFO system some sort of molecular organization and regulation, if it is to function properly, could be proposed.

Taking all our data together, the presented results demonstrate the capability of the photo-initiated cross-linking approach to study interactions of proteins within membrane environment. The used methodology reveals the formation of not only the P450 and cytochrome b₅ heterodimeric complex, but also the multimeric complexes within the membrane. These multimeres preserve the symmetric total P450:cytochrome b₅ molar ratio of 1:1 and probably at least two mutual orientations could be suggested (existence both heterooligomeric species P450:cytochrome b₅, the molar ratio 1:2 and 2:1, were determined at 1D SDS-PAGE). The similar protein band pattern was also detected using chemical cross-linking that in combination with MS analysis revealed two mutual orientations between P450 and cytochrome b₅ (Sulc et al., 2012). Therefore, the formation of such multimeric structures could be

also expected within the MFO system located in the endoplasmic membrane bilayer. The prepared cytochrome b₅ nanoprobe combined with photo-initiated cross-linking should be a challenging tool to study such structures not only in the reconstituted artificial proteo-liposomes as shown here, but also in the natural liver microsomal membranes.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Grant Agency of Czech Republic (P207/12/0627), and the Charles University in Prague (UNCE204025/2012). The equipment of the "Prague Infrastructure for Structure Biology and Metabolomics" which has been built up by financial support of the Operational Program Prague – Competitiveness (Project No.: CZ.2.16/3.1.00/24023) was used.

REFERENCES

- 1 Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali Ch, Paquet N, Ravier F, Sanchez J-Ch, Frutiger S, Hochstrasser DF (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. Electrophoresis **14**:1023-1031. (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html, 29th September 2014)
- 2 Bonfils C, Balny C, Maurel P (1981). Direct evidence for electron transfer from ferrous cytochrome b₅ to the oxyferrous intermediate of liver microsomal cytochrome P-450 LM2. J Biol Chem. **256**: 9457-9465.
- 3 Coon MJ (1978). Oxygen activation in the metabolism of lipids, drugs and carcinogens. Nutr Rev. **36**: 319-328.

- 450 4 Guengerich FP (2005). Human cytochrome P450 enzymes. In: Ortiz de
451 Montellano PR, editor. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and
452 Biochemistry. New York: Kluwer Press. p. 377–531.
- 453 5 Hlavica P (1984). On the function of cytochrome b5 in the cytochrome P-450-
454 dependent oxygenase system. Arch Biochem Biophys. **228**: 600-608.
- 455 6 Haladova K, Mrazek H, Jecmen T, Halada P, Man P, Novak P, Chmelik J,
456 Obsil T, Sulc M (2012). The combination of hydrogen/deuterium exchange or
457 chemical cross-linking techniques with mass spectrometry: Mapping of human
458 14-3-3 ζ homodimer interface. J Struct Biol. **179**: 10–17.
- 459 7 Im SC, Waskell L (2011). The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4
460 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b5. Arch
461 Biochem Biophys. **507**: 144-153.
- 462 8 Kalkhof S, Ihling C, Mechtler K, Sinz A (2005). Chemical cross-linking and
463 high-performance Fourier transform ion cyclotron resonance mass
464 spectrometry for protein interaction analysis: application to a calmodulin/target
465 peptide complex. Anal Chem. **77**: 495-503.
- 466 9 Koberova M, Jecmen T, Sulc M, Cerna V, Kizek R, Hudecek J, Stiborova M,
467 Hodek P (2013). Photo-cytochrome b5 – A New Tool to Study the
468 Cytochrome P450 Electron-transport Chain. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **8**:125 -
469 134.
- 470 10 Kotrbova V, Aimova D, Ingr M, Borek-Dohalska L, Martinek V, Stiborova M
471 (2009). Preparation of a biologically active apo-cytochrome b5 via
472 heterologous expression in Escherichia coli. *Protein Expr. Purif.*, **66**: 203-209.
- 473 11 Kotrbova V, Mrazova B, Moserova M, Martinek V, Hodek P, Hudecek J, Frei
474 E, Stiborova M (2011). Cytochrome b(5) shifts oxidation of the anticancer drug

475 ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to
 476 activation, thereby modulating its pharmacological efficacy. *Biochem*
 477 *Pharmacol.* **82**: 669-80.

478 12 Nelson RD, Strobel HW (1988). On the Membrane Topology of Vertebrate
 479 Cytochrome P-450 Proteins. *J Biol Chem.* **263**: 6038–6050.

480 13 Omura T, Sato R (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver
 481 microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem.* **239**: 2370–
 482 2378.

483 14 Pernecky SJ, Larson JR, Philpot RM, Coon MJ (1993). Expression of
 484 truncated forms of liver microsomal P450 cytochromes 2B4 and 2E1 in
 485 *Escherichia coli*: influence of NH₂-terminal region on localization in cytosol
 486 and membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 2651–2655.

487 15 Ptačkova R, Ječmen T, Novák P, Hudeček J, Stiborová M, Šulc M (2014). The
 488 Application of an Emerging Technique for Protein–Protein Interaction Interface
 489 Mapping: The Combination of Photo-Initiated Cross-Linking Protein
 490 Nanoprobes with Mass Spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* **15**:9224-9241.

491 16 Schenkman JB, Jansson I (2003). The many roles of cytochrome *b*₅.
 492 *Pharmacol. Ther.* **97**: 139-152.

493 17 Sinz A (2006). Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-
 494 dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass*
 495 *Spectrom Rev.* **25**: 663-682.

496 18 Stiborová M, Borek-Dohalská L, Hodek P, Mráz J, Frei E (2002). New
 497 selective inhibitors of cytochromes P450 2B and their application to
 498 antimutagenesis of tamoxifen. *Arch Biochem Biophys.* **403**: 41-49.

- 499 19 Stiborova M, Cerna V, Moserova M, Arlt VM and Frei E (2013) The effect of
500 benzo[a]pyrene on metabolic activation of anticancer drug ellipticine in mice.
501 *Neuro Endocrinol Lett* 34 (Suppl 2): 43-54.
- 502 20 Stier A, Kruger V, Eisbein T, Finch SAE (1991). Membrane topology of
503 cytochrome P-450: oligomers and cooperativity. in *Molecular Aspects of*
504 *Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds*. Arinç, Emel,
505 Schenkman, John B., Hodgson, Ernest (Eds.), Plenum Press, NY, Nato
506 Science Series A Vol. 202:115-121.
- 507 21 Suchanek M, A. Radzikowska A, Thiele C (2005). Photo-leucine and photo-
508 methionine allow identification of protein-protein interactions. *Nat. Methods*
509 **2(4)**:261-267.
- 510 22 Sulc M, Kubickova B, Maslova V, Hodek P (2004). Rabbit Liver Microsomal
511 System: Study of Interaction with Two Model N-Nitrosamines and Their
512 Metabolism. *Gen Physiol Biophys*. **23**: 423-433.
- 513 23 Sulc M, Peslova K, Zabka M, Hajduch M, Havlicek V (2009). Biomarkers of
514 Aspergillus spores: Strain typing and protein identification. *Int. J. Mass*
515 *Spectrom*. **280**: 162-168.
- 516 24 Sulc M, Hodek P, Stiborova M (2010). The binding affinity of carcinogenic N-
517 nitrosodimethylamine and N-nitrosomethylaniline to cytochromes P450 2B4,
518 2E1 and 3A6 does not dictate the rate of their enzymatic N-demethylation.
519 *Gen Physiol Biophys*. **29**: 175-185.
- 520 25 Sulc M, Jecmen T, Ptackova R, Novak P, Martinek V, Hodek P, Stiborova M,
521 Hudecek J (2012). Mapping of interaction between cytochrome P450 2B4 and
522 cytochrome b5: the first evidence of two mutual orientations. *Neuro Endocrinol*
523 *Lett*. **33**:41-47.

- 524 26 Vermilion JL, Coon MJ (1978). Purified liver microsomal NADPH-cytochrome
525 P-450 reductase. Spectral characterization of oxidation-reduction states. J Biol
526 Chem. **253**: 2694-2704.
- 527 27 Weichelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD (1988). Investigation of the
528 bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for
529 color formation. Anal Biochem. **175**: 231–237.
- 530 28 Yamamoto K, Durr UHN, Xu J, Im S-Ch, Pearcy P, Waskell L. Ramamoorthy A
531 (2013). Dynamic Interaction Between Membrane-Bound Full-Length
532 Cytochrome P450 and Cytochrome b5 Observed by Solid-State NMR
533 Spectroscopy. Sci Rep. 3:2538:1-5.
- 534 29 Yamamoto K, Gildenberg M, Ahuja S, Im S-Ch, Pearcy P, Waskell L.
535 Ramamoorthy A (2013). Probing the Transmembrane Structure and Topology
536 of Microsomal Cytochrome-P450 by Solid-State NMR on Temperature-
537 Resistant Bicelles. Sci Rep. 3:2556:1-6.
- 538

Figure 1. The characterization of the cytochrome b_5 photo-initiated cross-linking nanoprobe using: (A) 1D SDS-PAGE electrophoresis (15%, CBB R-250 staining, Sigma wide-range molecular weight standards in line 1) - purification process is illustrated in lines 2-8 (2 - *E.coli* lysate, 3 - supernatant after 100 000g ultracentrifugation, 4 - pellet after same ultracentrifugation, 5 - supernatant after protein solubilisation with detergent, 6 - pellet from the same sample like in line 5, 7 - collected fractions after the first DEAE-Sepharose CL4B, 8 - final preparation), (B) UV-VIS spectrum of 20 times diluted final preparation in range 240-500 nm loaded in cm^{-1} mode, or (C) MALDI-TOF MS of digested protein band from 1D SDS-PAGE using chymotrypsin (the selected m/z signals 2081.98 or 3256.61 correspond to peptides containing the Met96, Ser93-Trp110 or Ile80-Trp110, respectively. A circle labels the signal of peptide with Met and a square marks corresponding signal of same peptide with incorporated pMet with mass difference -19.972 m.u.).

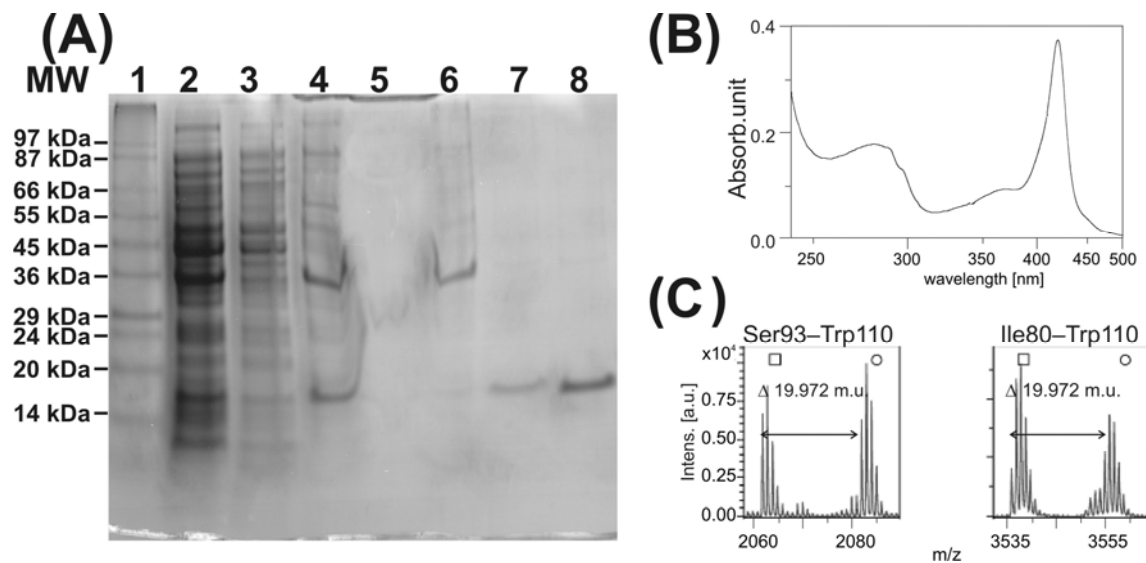


Figure 2. Monitoring of the cytochrome b_5 :P450 2B4 heterooligomers formation using photo-initiated cross-linking on (A) 12% 1D SDS-PAGE electrophoresis (silver staining, Sigma wide-range molecular weight standards). Arrow labels the heterooligomeric product and asterisk marks both monomers (cytochrome b_5 theoretical MW of 15 kDa and P450 2B4 theoretical MW of 56 kDa), or (B) 10% 2D SDS-PAGE electrophoresis (pI range from 5.5 to 8.5, silver staining, Sigma wide-range molecular weight standards). Arrow labels the heterooligomeric product; both monomers are not present (out of pI range of used IPG strip).

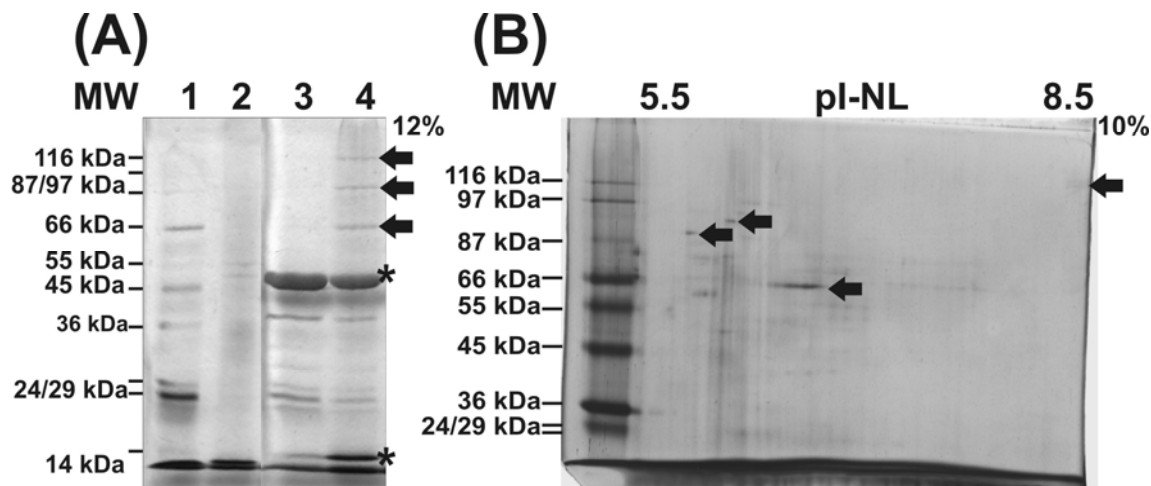
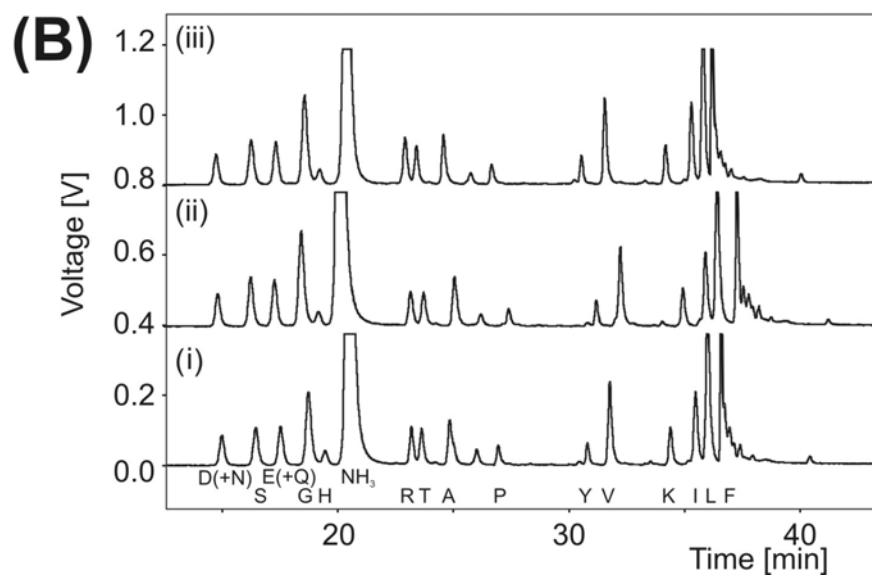
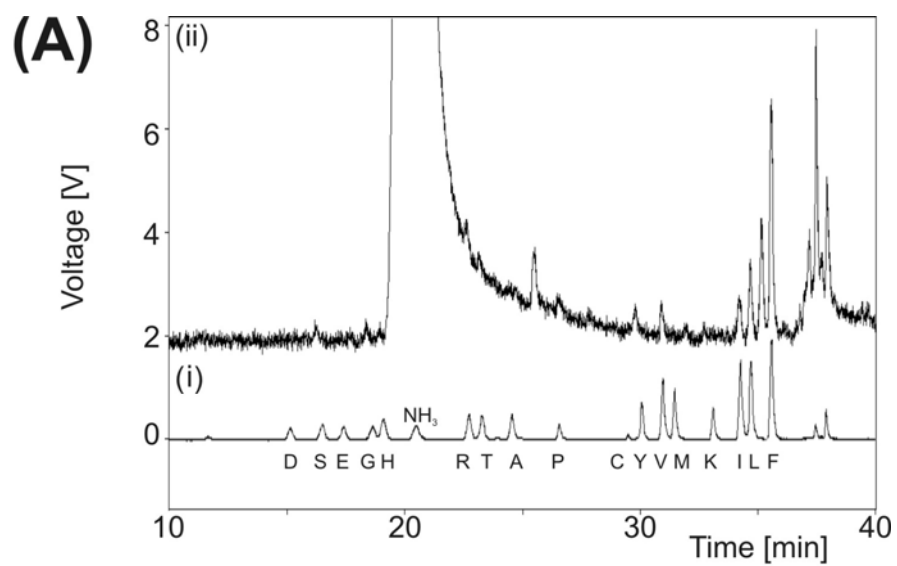


Figure 3. The HPLC chromatogram displaying the quantities of modified amino acid.

(A) The separation of (i) equimolar standard mixture of amino acids and (ii) directly proteolyzed protein band (cytochrome b_5 :P450 2B4 heterodimer in 1:1 molar ratio) excised from 12% SDS-PAGE polyacrylamide gel (the HPLC chromatogram is shifted 2 V units to the top). (B) The separation of mixtures of amino acids from protein bands corresponding to heterooligomeric cytochrome b_5 :P450 2B4 complexes electro-blotted at a PVDF after 1D SDS-PAGE electrophoresis: protein band with MW of (i) 68 ± 5 kDa, (ii) 88 ± 5 kDa, and (iii) 125 ± 5 kDa (the HPLC chromatograms marked (ii) and (iii) are shifted 0.4 V or 0.8 V units to the top, respectively). The one letter amino acid abbreviation or NH_3 for ammonia labels corresponding elution peak (below each peak) on the bottom of each picture.



574

575 Table 1. The values of determined ratios of the P450 2B4:cytochrome b₅ complexes after processing of AUC HPLC amino acid
576 analysis data (area under curve).

Determined aminoacid	Value of	Complex P450:cytochrome b ₅ in molar ratio						Average	S.D.
		1:1	1:2	2:1	1:3	1:4	1:5		
R	theor. q.	42	46	80	50	54	58		
	X	0.21	0.22	0.25	0.4	0.37	0.35	0.23	0.02
	Z	1.4	1.42	1.64	2.63	2.43	2.26	1.49	0.13
V	theor. q.	37	44	67	51	58	65		
	X	0.31	0.28	0.31	0.41	0.35	0.32	0.30	0.02
	Z	1.69	1.46	1.64	2.16	1.89	1.69	1.60	0.12
L	theor. q.	77	90	141	103	116	129		
	X	0.37	0.35	0.34	0.46	0.41	0.37	0.35	0.02
	Z	1.16	1.11	1.06	1.45	1.29	1.16	1.11	0.05
E (+Q)	theor. q.	58	72	102	86	90	104		
	X	0.42	0.44	0.41	0.49	0.47	0.41	0.42	0.02
	Z	1.27	1.3	1.23	1.46	1.39	1.21	1.27	0.04
G	theor. q.	41	47	76	53	59	65		
	X	0.33	0.34	0.29	0.42	0.37	0.34	0.32	0.03
	Z	1.53	1.59	1.4	1.86	1.67	1.52	1.51	0.12
F.	theor. q.	44	47	85	50	53	56		
	X	0.19	0.21	0.17	0.28	0.27	0.25	0.19	0.02
	Z	1.11	1.19	0.96	1.61	1.53	1.44	1.09	0.12
I	theor. q.	35	43	62	51	59	67		
	X	0.58	0.56	0.54	0.64	0.56	0.49	0.56	0.02
	Z	1.26	1.2	1.14	1.39	1.20	1.06	1.20	0.06
T	theor. q.	36	46	62	56	66	76		
	X	0.47	0.48	0.38	0.42	0.36	0.31	0.44	0.06

	Z	1.26	0.91	1.03	1.14	0.97	0.84	1.07	0.18
D (+N)	theor. q.	54	69	93	84	99	114		
	X	0.4	0.47	0.42	0.47	0.40	0.35	0.43	0.04
	Z	1.05	1.23	1.11	1.23	1.04	0.90	1.13	0.09
K	theor. q.	30	40	50	50	60	70		
	X	0.55	0.52	0.57	0.57	0.83	0.71	0.55	0.03
	Z	0.88	0.87	0.92	0.92	1.31	1.15	0.89	0.03

577 Legend: single letter amino acid abbreviations are used for each amino acid {aa} and its theoretical quantity (theor.q.) in protein
 578 band is shown, in both values X and Z the area under curve (corresponding to chromatographic peak) of each determined amino
 579 acid is used, the used formulas for calculation of values X and Z are
 580 $X = \text{area}\{\text{aa}\}\text{complex} / [\text{theor.q.}\{\text{aa}\}\text{complex} * (\text{area}\{\text{aa}\}\text{b}_5 / \text{theor.q.}\{\text{aa}\}\text{b}_5)]$, $Z =$
 581 $\text{area}\{\text{aa}\}\text{complex} / [\text{theor.q.}\{\text{aa}\}\text{complex} * (\text{area}\{\text{aa}\}\text{P450} / \text{theor.q.}\{\text{aa}\}\text{P450})]$, average and S.D. is calculated from three values of
 582 P450:cytochrome b₅ complexes in molar ratio 1:1, 1:2, and 2:1, bolded number of X or Z values marks significant difference from its
 583 proper value.